

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGÍA Y ANTROPOLOGÍA FÍSICA



ENVEJECIMIENTO POBLACIONAL Y DISCAPACIDAD  
COGNITIVA: FUNCIÓN RENAL EN SÍNDROME DE DOWN Y  
APROXIMACIÓN TERAPÉUTICA DEL AGUA SULFURADA EN  
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

TESIS DOCTORAL DE:

**RODRIGO GUZMÁN MARTÍNEZ**

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

**ÁNGELA CASADO MORAGÓN**

Madrid, 2013

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Departamento de Zoología y Antropología Física**



**Envejecimiento poblacional y discapacidad  
cognitiva: función renal en síndrome de Down y  
aproximación terapéutica del agua sulfurada en  
enfermedad de Alzheimer**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**RODRIGO GUZMÁN MARTÍNEZ**

Bajo la dirección de la Doctora

Ángela Casado Moragón

**Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC)**



**Madrid, 2013**



**ÍNDICE**

<b>ÍNDICE</b>	i
<b>ABREVIATURAS</b>	v
<b>ABSTRACT</b>	ix
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
1. ENVEJECIMIENTO POBLACIONAL	3
2. ESTRÉS OXIDATIVO	5
2.1 AGENTES OXIDANTES	5
2.1.1. Peróxido de hidrógeno	8
2.1.2. Homocisteína	9
2.2. AGENTES ANTIOXIDANTES	9
2.3. ESTRÉS OXIDATIVO, ENVEJECIMIENTO Y PATOLOGÍAS ASOCIADAS	10
2.4. BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO	11
3. SÍNDROME DE DOWN	14
3.1. ESTRÉS OXIDATIVO EN SD	16
3.2. ENVEJECIMIENTO EN SD	17
3.3. FUNCIÓN RENAL EN SD	18
3.3.1. Marcadores de función renal	19
3.4. FUNCIÓN TIROIDEA EN SD	20
4. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	21
4.1. MODELOS DE ESTUDIO DE LA EA	27
4.2. ESTRÉS OXIDATIVO EN EA	29
4.3. TERAPIAS ANTIOXIDANTES EN EA	30
4.3.1. Fármacos	30
4.3.2. Extractos de plantas	31
4.3.3. Nutrientes y vitaminas	32

5. AGUAS MINERO-MEDICINALES SULFURADAS	35
<b>II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	39
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	43
1. MUESTRA POBLACIONAL	45
1.1. MUESTRA POBLACIONAL SD	45
1.2. MUESTRA POBLACIONAL EA	46
2. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	46
3. TRATAMIENTOS ANTIOXIDANTES Y OXIDANTES EN EA	48
3.1. SELECCIÓN DE AGENTES ANTIOXIDANTES	48
3.2. SELECCIÓN DE AGENTES OXIDANTES	49
3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL DE LOS TRATAMIENTOS CELULARES	49
4. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS	52
4.1. DETERMINACIÓN DE CREATININA	52
4.2. DETERMINACIÓN DE GRAVEDAD ESPECÍFICA	52
4.3. DETERMINACIÓN DE DAÑO OXIDATIVO AL ADN	52
4.4. DETERMINACIÓN DE DAÑO OXIDATIVO A PROTEÍNAS	57
4.5. DETERMINACIÓN DE DAÑO OXIDATIVO POR GLICOXIDACIÓN	58
4.6. DETERMINACIÓN DE ESTATUS ANTIOXIDANTE	59
4.7. DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE MTT	59
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	60
<b>IV. RESULTADOS</b>	63
1. FUNCIÓN RENAL EN SD	65
1.1. INFLUENCIA DE SEXO Y EDAD	66
1.2. INFLUENCIA DE LA DIETA	69
1.3. INFLUENCIA DEL HIPOTIROIDISMO	70

2. DAÑO OXIDATIVO EN PACIENTES CON EA	72
2.1. DAÑO OXIDATIVO AL ADN	73
2.2. DAÑO OXIDATIVO A PROTEÍNAS	75
2.3. DAÑO OXIDATIVO POR GLICOXIDACIÓN	77
2.4. ESTATUS ANTIOXIDANTE	78
3. ESTUDIO DE LOS EFECTOS ANTIOXIDANTES DEL AS EN EA	80
3.1. ANÁLISIS PREVIO DE AGENTES ANTIOXIDANTES EN CMSP DE EA (TRATAMIENTOS A)	80
3.2. EFECTOS DE AGENTES OXIDANTES EN CMSP DE EA (TRATAMIENTOS B)	83
3.3. EVALUACIÓN DE EFECTOS PROTECTORES DEL AS EN CMSP DE EA (TRATAMIENTOS C)	84
<b>V. DISCUSIÓN</b>	89
1. EFECTOS GENERALES DEL ENVEJECIMIENTO POBLACIONAL EN SD Y EA	91
2. EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO POBLACIONAL SOBRE LA FUNCIÓN RENAL EN SD	93
2.1. INFLUENCIA DEL SEXO SOBRE MARCADORES DE FUNCIÓN RENAL EN SD	94
2.2. INFLUENCIA DE LA EDAD SOBRE MARCADORES DE FUNCIÓN RENAL EN SD	95
2.3. INFLUENCIA DE LA DIETA SOBRE MARCADORES DE FUNCIÓN RENAL EN SD	98
2.4. INFLUENCIA DEL HIPOTIROIDISMO SOBRE MARCADORES DE FUNCIÓN RENAL EN SD	99
3. ANÁLISIS DE BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN EA	102
3.1. EVALUACIÓN DE DAÑO OXIDATIVO AL ADN EN CMSP	102
3.2. EVALUACIÓN DE DAÑO OXIDATIVO A PROTEÍNAS	105
3.3. EVALUACIÓN DE DAÑO OXIDATIVO POR GLICOXIDACIÓN	106
3.4. EVALUACIÓN DE ESTATUS ANTIOXIDANTE	107

4. USO DEL AGUA SULFURADA COMO APROXIMACIÓN TERAPÉUTICA EN EA	109
4.1. LA ADICIÓN DE AGENTES OXIDANTES TIENE EFECTOS NEGATIVOS EN LAS CMSP DE PACIENTES CON EA	110
4.2. EL AS PROTEGE FRENTE A INDUCCIÓN DE DAÑO OXIDATIVO EN CMSP EN PACIENTES DE EA	112
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	117
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	121
<b>ANEXOS</b>	
I. ANÁLISIS A <i>POSTERIORI</i> DE LAS EDADES DE LOS PARTICIPANTES EN POBLACIÓN EA Y POBLACIÓN CONTROL	165
II. ANÁLISIS A <i>POSTERIORI</i> DE LOS TRATAMIENTOS CON ANTIOXIDANTES COMPARADOS CON LOS TRATAMIENTOS OXIDANTES EN POBLACIÓN CON EA Y POBLACIÓN CONTROL	169
III. BIOMARKERS OF AGE EFFECT ON RENAL FUNCTION IN DOWN SYNDROME	173

**ABREVIATURAS**

<b>8-OHdG</b>	8-hidroxi-2'-deoxiguanosina
<b>A<math>\beta</math></b>	Péptido $\beta$ -amiloide
<b>AA</b>	Ácido ascórbico
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADP</b>	Adenosín di-fosfato (del inglés <i>Adenosine DiPhosphate</i> )
<b>AF</b>	Ácido fólico
<b>AFP</b>	Alfa fetoproteína
<b>AGEs</b>	Productos finales de glicación avanzada (del inglés <i>Advanced Glycation End-products</i> )
<b>AINes</b>	Antiinflamatorios no esteroideos
<b>ANOVA</b>	Análisis de la varianza (del inglés <i>Analysis Of Variance</i> )
<b>AOPP</b>	Productos avanzados de oxidación proteica (del inglés <i>Advanced Oxidation Protein Products</i> )
<b>APP</b>	Proteína precursora amiloide (del inglés <i>Amiloid Precursor Protein</i> )
<b>AS</b>	Agua sulfurada
<b>ATP</b>	Adenosín tri-fosfato (del inglés <i>Adenosine TriPhosphate</i> )
<b>BDNF</b>	Factor neurotrófico derivado del cerebro (del inglés <i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i> )
<b>BPF</b>	Bajo punto de fusión
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>CMSP</b>	Células mononucleares de sangre periférica
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenasa 2
<b>Cr</b>	Creatinina
<b>DCL</b>	Deterioro cognitivo leve
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido



<b>DNPH</b>	Di-nitrofenilhidrazina (del inglés <i>DiNitroPhenilHidrazine</i> )
<b>DTNB</b>	Ácido ditionitrobenzoico (del inglés <i>DiThioNitroBenzoic acid</i> )
<b>DYRK1A</b>	Quinasa reguladora de la fosforilación de la tirosina de doble especificidad 1A (del inglés <i>Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A</i> )
<b>EA</b>	Enfermedad de Alzheimer
<b>EDAD</b>	Encuesta de Discapacidad, Autonomía Personal y Situaciones de Dependencia
<b>EDTA</b>	Ácido etilen-diamino-tetraacético (del inglés <i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i> )
<b>FAD</b>	Flavín adenín dinucleótido oxidado
<b>FADH<sub>2</sub></b>	Flavín adenín dinucleótido reducido
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	Molécula de hierro reducida
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	Molécula de hierro oxidada
<b>Fe<sup>2+</sup>-TPTZ</b>	Tripiridil-triazina ferrosa
<b>Fe<sup>3+</sup>-TPTZ</b>	Tripiridil-triazina férrica
<b>FRAP</b>	Ensayo de habilidad para reducir el ión férrico del plasma (del inglés <i>Ferric Reducing Ability of Plasma</i> )
<b>GE</b>	Gravedad específica
<b>GH</b>	Hormona del crecimiento (del inglés <i>Growth Hormone</i> )
<b>GPx</b>	Glutación peroxidasa
<b>GR</b>	Glutación reductasa
<b>GSH</b>	Glutación reducido
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>HO<sub>2</sub><sup>·</sup></b>	Radical hidroperoxilo
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Sulfuro de hidrógeno
<b>hCG</b>	Gonadotropina coriónica humana (del inglés <i>human Chorionic Gonadotropine</i> )

<b>HCY</b>	Homocisteína
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución (del inglés <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
<b>IGF-I</b>	Factor de crecimiento insulínico tipo I (del inglés <i>Insulin-like Growth Factor-I</i> )
<b>LSD</b>	Mínima diferencia significativa (del inglés <i>Least Significance Difference</i> )
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
<b>NAC</b>	N-acetil-cisteína
<b>NaCl</b>	Cloruro sódico
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamida adenín dinucleótido oxidado
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenín dinucleótido reducido
<b>NaOH</b>	Hidróxido sódico
<b>NINCDS-ADRDA</b>	Instituto americano de enfermedades neurológicas, cognitivas e infarto y de la Asociación de Alzheimer y enfermedades relacionadas (del inglés <i>National Institute of Neurologic, Communicative Disorders and Stroke - Alzheimer's Disease and Related Disorders Association</i> )
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	Radical superóxido
<b>OH<sup>-</sup></b>	Anión hidróxido
<b>OH<sup>•</sup></b>	Radical hidroxilo
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino (del inglés <i>Phosphate Buffer Saline</i> )
<b>PET</b>	Tomografía por emisión de positrones (del inglés <i>Positron Emission Tomography</i> )
<b>PH</b>	Peróxido de hidrógeno
<b>Pi</b>	Fosfato inorgánico
<b>RL</b>	Radical libre
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>RNS</b>	Especies reactivas del nitrógeno (del inglés <i>Reactive Nitrogen Species</i> )
<b>ROS</b>	Especies reactivas del oxígeno (del inglés <i>Reactive Oxygen Species</i> )

<b>RPMI-1640</b>	Medio Roswell Park Memorial Institute 1640
<b>SCGE</b>	Electroforesis en gel de células aisladas (del inglés <i>Single Cell Gel Electrophoresis</i> )
<b>SD</b>	Síndrome de Down
<b>-SH</b>	Grupos tiol
<b>SIDA</b>	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
<b>SOD1</b>	Cu/Zn superóxido dismutasa
<b>T<sub>3</sub></b>	Triyodotironina
<b>T<sub>4</sub></b>	Tiroxina
<b>TAC</b>	Tomografía axial computerizada
<b>TBARS</b>	Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (del inglés <i>ThioBarbituric Acid-Reacting Substances</i> )
<b>TIFF</b>	Formato de archivo de imágenes con etiquetas (del inglés <i>Tagged Image File Format</i> )
<b>TNB</b>	Ácido tiobenzoico (del inglés <i>ThioNitroBenzoic acid</i> )
<b>TSH</b>	Hormona estimulante de la tiroides (del inglés <i>Thyroid Stimulating Hormone</i> )
<b>UA</b>	Unidades arbitrarias
<b>UAF</b>	Unidades arbitrarias de fluorescencia
<b>UV</b>	Ultra-violeta

## ABSTRACT

### INTRODUCTION

Population aging is a phenomenon that is happening worldwide. Thanks to advances in medicine, research and disease prevention policies, life expectancy has been increased in recent decades (Otero *et al.*, 2004). In addition, this event has also been assisted by a decline in the fertility rate (United Nations, 2002). The main result is that groups of older population have increased their number in relation to the younger population, and predictions for the coming years indicate that this trend will continue (Kinsella *et al.*, 2005).

Spain is one of the countries with higher levels of life expectancy in the world, and predictions for the future indicate that it will be the oldest country in the whole world at year 2050 (Otero *et al.*, 2004). In order to understand these predictions it is important to remark the important changes that Spanish society has undergone during last century, such as economic growing, massive urbanization of rural areas and general access to potable water, creation of the National Health Service, or main advances in diagnosis and treatment of different diseases (Otero *et al.*, 2004).

Thus, it has been observed that populations that formerly had a shorter life expectancy, as in the case of people with Down syndrome (DS), have attained the age in which new issues may arise related to aging organism (Bittles and Glasson, 2004; Barnhart and Connolly, 2007). On the other hand, it has been also reported an increase in the number of cases of people developing Alzheimer's disease (AD), as more and more people arriving at high ages.

DS is the first cause of mental retardation in the world with a frequency of 1 out 700-1000 live births (Hook, 1981; Sherman *et al.*, 2007). Clinical symptoms were first described by John Langdon Down in 1866, but the association with one extra copy of chromosome 21 was first reported by Lejeune (1959). DS patients present different morphological characteristics such as short stature, obesity and bilateral epicanthic eyefolds. Moreover, they have increased risk of different systemic disorders, such as thyroid dysfunction (Korsager *et al.*, 1978). Furthermore, growth retardation has been noted during life and also they have an elevated oxidative stress that leads to premature aging and that may lead to premature onset of AD (Bush and Beail, 2004; Casado *et al.*, 2007). In fact, between 10% and 55% of DS people from 40 to 59 years

will develop EA (van Dyke et al., 1998). However, there is little evidence in scientific literature of renal function disorders.

AD is the most common cause of dementia in older people in the world. The principal clinical symptoms of the disease are general cognitive decline, loss of memory and inability to reasoning (Alzheimer, 1907). Physiological manifestations in the brain are mainly two:  $\beta$ -amyloid plaques and neurofibrillary tangles (Schaeffer *et al.*, 2011). But the pathogenesis of the disease is still not clear. There are some theories about that, like the amyloid cascade hypothesis, but it has been revised several times and it remains unclear (Pimplikar, 2009). Nevertheless, it is well known that oxidative stress is one of the main cause or consequence of the disease (Aluise *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2010). Furthermore, this elevated oxidative stress can be observed not only in brain tissue but also in peripheral tissues, such as blood tissue (Mórocz *et al.*, 2002; Kadioglu *et al.*, 2004; Leutner *et al.*, 2005; Casado *et al.*, 2008; Sultana *et al.*, 2011). Actually, blood tissue is one of the best options to use in researching AD, since it can provide a lot of information about different issues, such as therapeutic approaches.

Sulphurous water (SW) has been used as therapeutic agent since second half of twentieth century (Mozota-Sagardia, 1960; Passa, 1964; Ricci and Zaccone, 1975; Pisaneschi, 1979; Prévost *et al.*, 1983). One of the main features of SW is the presence of hydrogen sulfide, which confers its antioxidant activity. Since oxidative stress plays an important role in AD, it was proposed as a possible treatment to improve life quality in AD patients.

## RESEARCH CONTENTS

This Doctoral Thesis has addressed an analysis of the possible consequences of population aging in two population samples with cognitive disabilities (DS and AD). As a first objective, it has been proposed to determine if there is any failure in renal function in persons with DS, using two different renal biomarkers, creatinine (Cr) and specific gravity (SG) in urine samples. Cr was determined by a spectrophotometric method based on Jaffé reaction (Jaffé, 1986) and SG was measured using refractometry. It has been also analyzed the relationships of these biomarkers with respect to sociodemographic parameters (genre, age and diet) as well as to incidence of hypothyroidism, the most common thyroid disorder in DS (Tüysüz and Beker, 2001; Barnhart and Connolly, 2007). In the case of AD, several oxidative stress biomarkers were determined in blood tissue (damage to DNA, proteins, carbohydrates and plasma antioxidant capacity) to assess the oxidative status of the selected population sample.

Afterwards, a therapeutic *in vitro* approach of SW was performed in peripheral mononuclear cells (PMNC) using Comet assay (that measures oxidative DNA damage) and MTT assay (an indicator of cell viability). Furthermore, SW effects were compared with those produced by recognized antioxidant (vitamins C and E, and N -acetyl cysteine). Each population sample was compared with a control population from the same geographical region.

DS results showed that Cr and SG were significantly decreased in DS compared to control population. Attending to genre comparisons, there were no differences between males and females in both parameters. Influence of age analysis revealed that differences in Cr and SG could be observed from adulthood. Moreover, a negative significant correlation was observed between SG and age in both populations, being the slope of linear regression two-fold higher in DS population. Diet analysis did not indicate significant differences between populations in all kind of analyzed food intake, including meat intake. These data suggest a possible renal failure in DS maybe caused by the high oxidative stress characteristic of this syndrome. Furthermore, hypothyroidism comparison results indicated that people with DS who were medicated with levothyroxine had significant decreased levels than those without hypothyroidism, indicating that hypothyroidism may also be influencing an impaired renal function. In addition, when DS population with hypothyroidism was subtracted there were still significant differences between DS and control population, strengthening the renal failure hypothesis. Thus, new clinical and medical monitoring may have been considered in this population.

AD results indicated, as it was expected, that all oxidative stress biomarkers were significantly increased compared to control population. Besides, antioxidant status biomarkers were significantly decrease compared to control population. Finally, no differences were found when influence of genre or age was studied. SW therapeutic approach results showed that SW protected *in vitro* against increased oxidative stress in PMNC in both populations. A decrease in parameters of oxidative damage to DNA also avoided loss of cell viability of these cells. The effect of SW in both oxidative DNA damage and cell viability parameters was similar to those of the other antioxidants used (vitamins C and E , N-acetyl cysteine), indicating that further research can be addressed to include SW as a possible therapy for AD.

## CONCLUSIONS

People with DS have decreased levels of Cr and SG, primarily from adulthood. This aspect can be a symptom of its typical premature aging caused by oxidative

stress. There is no influence of genre or diet, but hypothyroidism seems to be an important issue in renal function, since levothyroxine does not fix levels of Cr and SG to its normal state. Thus, a new aspect of DS population is proposed to be monitored, because life expectancy in this syndrome is increasing every decade.

On the other hand, this is the first time that antioxidant effects of SW have been proved in oxidative DNA damage biomarkers related to cell viability in AD. Thus, this Doctoral Thesis opens a new way of research in therapeutics for AD to improve their quality of life. Despite further research is needed, this results supports the idea of using health resorts to treat not only AD but also other diseases related to oxidative stress, such as DS.

## REFERENCES

- Aluise, C.D., Robinson, R.A., Beckett, T.L., Murphy, M.P., Cai, J., Pierce, W.M., Markesbery, W.R., Butterfield, D.A. Preclinical Alzheimer disease: brain oxidative stress, Abeta peptide and proteomics. *Neurobiol Dis.* 2010; 39(2): 221-228.
- Alzheimer, A. Über eine eigenartige Erkrankungskrankung der Hirnrinde. *Allg Z Psychiatr.* 1907; 64: 146-148.
- Barnhart, R.C., Connolly, B. Aging and Down syndrome: implications for physical therapy. *Phys Ther.* 2007; 87(10): 1399-1406.
- Bittles, A.H., Glasson, E.J. Clinical, social, and ethical implications of changing life expectancy in Down syndrome. *Dev Med Child Neurol.* 2004; 46(4): 282-286.
- Bush, A., Beail, N. Risk factors for dementia in people with down syndrome: issues in assessment and diagnosis. *Am J Ment Retard.* 2004; 109(2): 83-97.
- Casado, A., López-Fernández, M.E., Ruíz, R. Lipid peroxidation in Down syndrome caused by regular trisomy 21, trisomy 21 by Robertsonian translocation and mosaic trisomy 21. *Clin Chem Lab Med.* 2007; 45(1): 59-62.
- Casado, A., López-Fernández, M.E., Casado, M.C., de La Torre, R. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in vascular and Alzheimer dementias. *Neurochem Res.* 2008; 33(3): 450-458.
- Down, J.L.H. Observations on an ethnic classification of idiots. *Clinical Lecture Reports, London Hospital.* 1866; 3: 259-262.

- van Dyke, D.C., Harper, D.C., Dyken, E. Alzheimer's disease and Down syndrome. *Down Syndrome Quart.* 1998; 3(3): 1-11.
- Hook, E.B. Down's syndrome-frequency in human populations and factors pertinent to variation in rates. En: de la Cruz, F.F., Gerald, P.S., editores. *Trisomy 21 (Down syndrome): research perspectives.* Baltimore: University Park Press. 1981; p. 3-68.
- Jaffé, M. (1986). Über den niederschlag, welchen pikrinsäure in normalen harn erzeugt und über eine neue reaktion des kreatinins. *Z Physiol Chem.* 1986; 10: 391-400.
- Kadioglu, E., Sardas, S., Aslan, S., Isik, E., Esat-Karakaya, A. Detection of oxidative DNA damage in lymphocytes of patients with Alzheimer's disease. *Biomarkers.* 2004; 9(2): 203-209.
- Kinsella, K., Phillips, D.R. *Global Aging: The Challenge of Success.* Population Bulletin. 2005; 60 (1): 5-42.
- Korsager, S., Chatham, E.M., Ostergaard-Kristensen, H.P. Thyroid function tests in adults with Down's syndrome. *Acta Endocrinol.* 88: 1978; 48-54.
- Lejeune, J., Gautier, M., Turpin, R. Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *CR Hebd Acad Sci.* 1959; 248: 1721-1722.
- Leutner, S., Schindowski, K., Frölich, L., Maurer, K., Kratzsch, T., Eckert, A., Müller, W.E. Enhanced ROS-generation in lymphocytes from Alzheimer's patients. *Pharmacopsychiatry.* 2005; 38(6): 312-315.
- Mórocz, M., Kálmán, J., Juhász, A., Sinkó, I., McGlynn, A.P., Downes, C.S., Janka, Z., Raskó, I. Elevated levels of oxidative DNA damage in lymphocytes from patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2002; 23(1): 47-53.
- Mozota-Sagardia, J.R. Sulfurous crenotherapy in otorhinolaryngology. *Clin Lab (Zaragoza).* 1960; 70: 1-10.
- Otero, A., Zunzunegui, MV, Rodríguez-Laso, A., Aguilar, MD., Lázaro, P. Volumen y tendencias de la dependencia asociada al envejecimiento en la población española. *Rev Esp Salud Pública.* 2004; 78: 201-213.
- Passa, J. Senescence and possibilities of sulfurous crenotherapy in respiratory pathology. *Gaz Med Fr.* 1964; 71: 1741-1742.



- Pimplikar, S.W. Reassessing the Amyloid Cascade Hypothesis of Alzheimer's Disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009; 41(6): 1261-1268.
- Pisaneschi, M. Inhalation therapy with sulfurous water in aged patients. *Poumon Coeur.* 1979; 35(6): 401-402.
- Prévost, M.C., Montastruc, P., Douste-Blazy, L. The effect of vaporization with thermal sulfurous water on phospholipids in the broncho-alveolar lavage solution following hypobaric hypoxia in the rat. *Arch Int Physiol Biochim.* 1983; 91(3): 197-203.
- Ricci, G., Zaccone, G. Sulfurous-salt hydropinotherapy in minor hepato-digestive pathology. Preliminary results with Acqua Marcia di Acqui. *Minerva Ecol Idroclimatol Fis Sanit.* 1975; 15(2): 48-58.
- Schaeffer, E.L., Figueiro, M., Gattaz, W.F. Insights into Alzheimer disease pathogenesis from studies in transgenic animal models. *Clinics (Sao Paulo).* 2011; 66 Suppl 1: 45-54.
- Sherman, S.L., Allen, E.G., Bean, L.H., Freeman, S.B. Epidemiology of Down syndrome. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2007; 13(3): 221-227.
- Singh, M., Dang, T.N., Arseneault, M., Ramassamy, C. Role of by-products of lipid oxidation in Alzheimer's disease brain: a focus on acrolein. *J Alzheimers Dis.* 2010; 21(3): 741-756.
- Sultana, R., Mecocci, P., Mangialasche, F., Cecchetti, R., Baglioni, M., Butterfield, D.A. Increased protein and lipid oxidative damage in mitochondria isolated from lymphocytes from patients with Alzheimer's disease: insights into the role of oxidative stress in Alzheimer's disease and initial investigations into a potential biomarker for this dementing disorder. *J Alzheimers Dis.* 2011; 24(1): 77-84.
- Tüysüz, B., Beker, D.B. Thyroid dysfunction in children with Down's syndrome. *Acta Paediatr.* 2001; 90(12): 1389-1393.
- United Nations. Dept. of Economic and Social Affairs. Population Division. World population aging, 1950-2050. United Nations, editores. New York. 2002; 483pp.

# **I. INTRODUCCIÓN**



## 1. ENVEJECIMIENTO POBLACIONAL

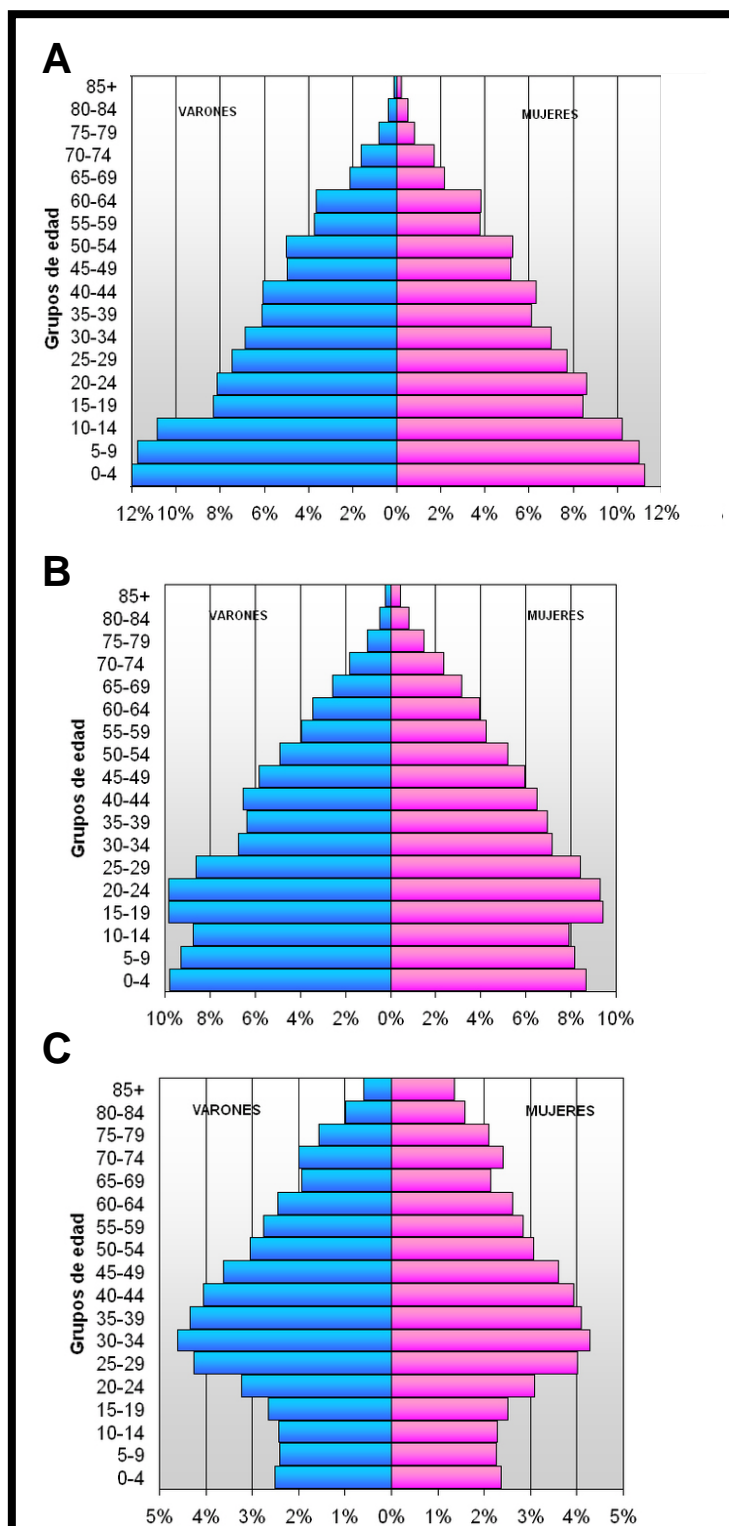
El ritmo de crecimiento de la población mundial está aumentando en los últimos años. Según la Organización de Naciones Unidas, hoy en día el número de personas que viven en el mundo son alrededor de 7000 millones y esta misma organización estima que en el año 2050 habrá alrededor de 9000 millones de personas (United Nations, 2002). Además de este crecimiento en la población mundial, también se está produciendo un paulatino envejecimiento de la misma. Según Otero *et al.* (2004), este hecho puede tomarse como un éxito en la historia de la humanidad, pues puede achacarse al triunfo de la sanidad pública, los avances médicos y el desarrollo económico sobre las lesiones y enfermedades que han limitado la esperanza de vida en los humanos desde hace milenios.

Actualmente, debido al aumento de la esperanza de vida y a la disminución de la tasa de fecundidad (United Nations, 2002), la proporción de personas mayores de 60 años está aumentando más rápidamente que cualquier otro grupo de edad en casi todos los países del mundo (Kinsella *et al.*, 2005). Y esto no ocurre solamente en los países desarrollados, como se podría llegar a pensar. Este envejecimiento poblacional ha comenzado recientemente también en los países menos desarrollados (Kinsella *et al.*, 2005). Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud, la población mundial de 60 años o más es de 650 millones y se calcula que, en el año 2050, alcanzará los 2000 millones. Esto supone un crecimiento porcentual del 9% al 22% en sólo 40 años.

Por otro lado, conforme a la Base de Datos de Mortalidad Humana (Christensen *et al.*, 2009), las tasas de mortalidad actuales en los países líderes en esperanza de vida (Japón, España y Suecia) supondrían que, incluso aunque las condiciones sanitarias no mejoraran, tres cuartas partes de los recién nacidos lograrían celebrar su 75 cumpleaños. Incluso, si el crecimiento en la esperanza de vida en estos países continuara al mismo ritmo, muchos de los bebés nacidos a partir del año 2000 podrían celebrar su centenario (Christensen *et al.*, 2009).

Según un reciente informe de la Organización de Naciones Unidas, en el año 2050 España será el país más envejecido del mundo. El 44,1% de la población española será mayor de 60 años y la mediana de edad será de 55,2 años frente a una mediana global mundial de 36,2 años (Otero *et al.*, 2004). En la Figura 1 pueden apreciarse tres pirámides de población para España representativas de los últimos 100 años, donde se puede observar cómo el número de personas de edad avanzada ha

aumentado. Además, también se refleja el característico estrechamiento de la base de la pirámide, indicativo del progresivo envejecimiento de la población española.



**Figura 1. Pirámides de población en España. A. Año 1900:** Un 1% en la gráfica representa unas 186.974 personas. **B. Año 1950:** Un 1% en la gráfica representa unas 279.631 personas. **C. Año 2007:** Un 1% en la gráfica representa a unas 451.169 personas. Gráficas realizadas en base a los datos del Instituto Nacional de Estadística.

Para entender que España sea uno de los países con mayor esperanza de vida del mundo han de tenerse en cuenta los grandes cambios sociales y económicos que se han producido en nuestro país durante el siglo XX, especialmente en su última mitad, como el aumento del Producto Interior Bruto, la urbanización y el acceso universal al agua potable, la reducción de las enfermedades infecciosas, la cobertura universal del Sistema Nacional de Salud y los avances conseguidos en el diagnóstico y tratamiento de distintas enfermedades (Otero *et al.*, 2004).

Por otro lado, el que la población en su conjunto alcance edades cada vez más elevadas la expone a la generalización de enfermedades y contingencias, propias de la vejez y de la gran vejez, que en el pasado eran marginales.

De acuerdo a los motivos expuestos, no es de extrañar que síndromes cuya esperanza de vida se ha visto aumentada en gran medida, como el síndrome de Down (SD), o patologías asociadas al envejecimiento, como la Enfermedad de Alzheimer (EA), cobren una gran relevancia. En estas circunstancias se plantean nuevos retos, como la posible aparición de nuevas patologías asociadas al envejecimiento (en el caso del SD), o la búsqueda de una mejor calidad de vida en personas con EA. Por ello, esta Tesis Doctoral trata de aportar nuevos datos sobre estas dos patologías estrechamente relacionadas, dado que se prevé que la tendencia mencionada sobre el envejecimiento poblacional mundial continúe.

## **2. ESTRÉS OXIDATIVO**

El estrés oxidativo fue definido en 1991 por Helmut Sies como “la perturbación en el balance entre agentes oxidantes y antioxidantes en la célula, a favor de los primeros”. Posteriormente, se ha definido el daño oxidativo como “el daño biomolecular causado por el ataque de especies reactivas sobre los constituyentes de los organismos vivos” (Halliwell y Gutteridge, 2007).

### **2.1. AGENTES OXIDANTES**

Los agentes oxidantes se forman principalmente como resultado del metabolismo celular aeróbico, siendo los más importantes los radicales libres (RL), las especies reactivas del oxígeno (ROS) y las especies reactivas del nitrógeno (RNS). En la Tabla 1 se pueden observar los RL y especies reactivas más importantes.

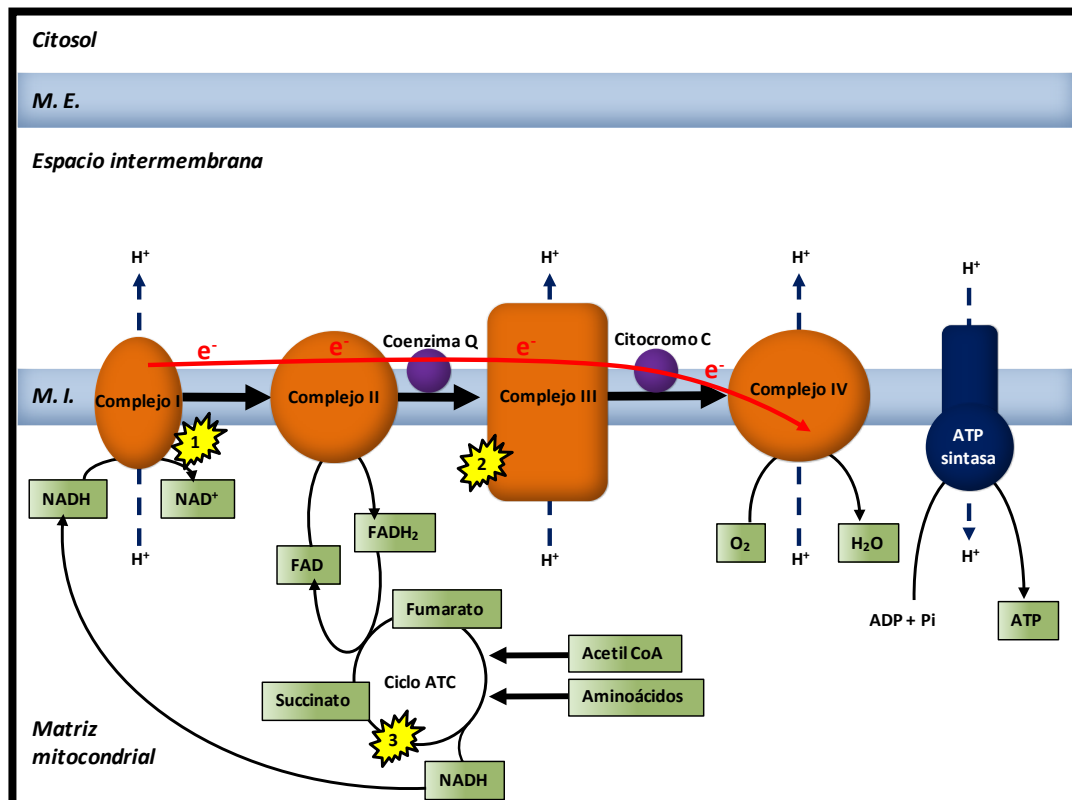
**Tabla 1. Especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS).** La columna de la izquierda muestra las especies consideradas RL y la columna de la derecha muestra las especies no radicales. En las fórmulas químicas la letra "R" representa una cadena de hidrocarburos.

Radicales libres	Especies no radicales
Especies reactivas de oxígeno (ROS)	
Radical superóxido, $O_2^{\cdot -}$	Peróxido de hidrógeno, $H_2O_2$
Radical hidroxilo, $OH^{\cdot}$	Peróxidos orgánicos, $ROOH$
Radical hidroperoxilo, $HO_2^{\cdot}$	Peroxinitrito, $ONOO^-$ <sup>a</sup>
Radical peroxilo, $RO_2^{\cdot}$	Peroxinitrato, $O_2NOO^-$ <sup>a</sup>
Especies reactivas de nitrógeno (RNS)	
Óxido nítrico, $NO^{\cdot}$	Ácido nitroso, $HNO_2$
Dióxido de nitrógeno, $NO_2^{\cdot}$	Catión nitrosilo, $NO^+$
Nitrato, $NO_3^{\cdot}$	Anión nitroxilo, $NO^-$

<sup>a</sup>Estos compuestos también se consideran RNS.

Los RL pueden formarse por reacciones de transferencia de electrones, tras la pérdida o la obtención de un electrón de una especie no radical. En estas transferencias se necesita energía, que puede provenir bien de fuentes externas (calor, luz ultravioleta o radiación ionizante, por ejemplo) o de reacciones redox. A su vez, estas reacciones redox pueden estar catalizadas enzimáticamente, por metales o por proteínas no enzimáticas (Slater, 1984). Las reacciones redox no se dan de manera aislada, sino que pueden acoplarse entre sí, formando parte de sistemas más complejos en los organismos y dando lugar a la mayoría de los RL y especies reactivas conocidas.

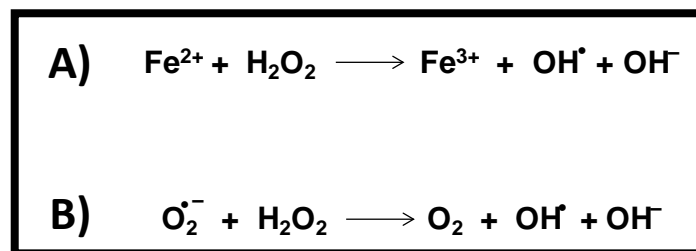
Las reacciones redox catalizadas enzimáticamente se encuentran principalmente en la mitocondria, y se llevan a cabo mayoritariamente por enzimas oxidorreductasas (Figura 2).



**Figura 2. Esquema ilustrativo de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria.** Figura compuesta a partir de Ricci *et al.* (2003) y Beal (2005). Los puntos 1, 2 y 3 se corresponden con los lugares donde se generan las especies reactivas. **M.E.:** membrana externa; **M.I.:** membrana interna; **e<sup>-</sup>:** electrón, **H<sup>+</sup>:** protón; **NADH:** Nicotinamida adenín dinucleótido reducido; **NAD<sup>+</sup>:** Nicotinamida adenín dinucleótido oxidado; **FAD:** Flavín adenín dinucleótido oxidado; **FADH<sub>2</sub>:** Flavín adenín dinucleótido reducido; **ADP:** Adenosín difosfato; **Pi:** fosfato inorgánico; **ATP:** Adenosín trifosfato.

Algunos metales, como el hierro o el cobre, son capaces de catalizar reacciones redox en las que un solo electrón puede ser aceptado o donado por el metal y generar RL y ROS. Las reacciones más importantes son la reacción de Fenton (Figura 3A) y la reacción de Haber-Weiss (Figura 3B). En estas reacciones, una molécula de hierro reducido ( $\text{Fe}^{2+}$ ) puede catalizar la transformación del anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) hasta la generación del radical hidroxilo ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) mediante su interacción con el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Asimismo, la molécula de hierro que queda reducida ( $\text{Fe}^{3+}$ ) tras esta transformación puede volver a oxidarse en presencia del  $\text{H}_2\text{O}_2$  que quede en el medio celular, produciendo el radical hidroperoxilo ( $\text{HO}_2^{\bullet}$ ). De este modo, los nuevos RL generados pueden interaccionar de nuevo con otras moléculas, potenciando de esta manera los efectos del  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Estudios recientes sitúan la reacción de Fenton en el retículo endoplasmático o la zona perinuclear de la célula, pero no en la mitocondria u otros compartimentos celulares (Liu *et al.*, 2004).





**Figura 3. Reacciones redox catalizadas por metales capaces de generar RL y ROS. A. Reacción de Fenton. B. Reacción neta de Haber-Weiss**

Sin embargo, el papel de los agentes oxidantes no siempre es dañino para el organismo. A las concentraciones adecuadas participan y son necesarios en diferentes procesos metabólicos. De este modo pueden actuar como agentes vasodilatadores para regular la presión sanguínea, como es el caso del óxido nítrico (Ignarro *et al.*, 1987), pueden participar en la respuesta inmune frente a patógenos bacterianos, virales o frente a células cancerosas (Babior, 1984; Nathan, 1992) y forman parte de múltiples vías de señalización celulares, algunas tan importantes como la secreción y acción hormonal, el transporte de iones, la transcripción de diversos factores, la neuromodulación o la apoptosis (Lander, 1997). A continuación se describen brevemente los dos agentes oxidantes utilizados en la presente Tesis Doctoral.

### **2.1.1. Peróxido de hidrógeno**

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es un líquido viscoso azulado, cuyo punto de ebullición está determinado en 150 °C. Es producido en reacciones de dismutación de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  y también por varias enzimas. Aunque no es una especie muy reactiva, se sabe que tiene efectos tóxicos para las células en el rango de concentración comprendido entre 10 y 100  $\mu\text{M}$ . El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es capaz de atravesar la membrana plasmática y reaccionar con el hierro o el cobre para formar especies más reactivas como el  $\text{OH}^\bullet$  en zonas más alejadas de su lugar de producción (Halliwell y Gutteridge, 2007). Por otro lado, se ha demostrado que la exposición de células a  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede incrementar la producción de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  mediante la activación de la enzima NADPH oxidasa (Coyle *et al.*, 2006). Además, también es capaz de inactivar ciertas enzimas, normalmente por la oxidación de sus grupos tiol ( $-\text{SH}$ ), esenciales para la catálisis (Halliwell y Gutteridge, 2007). Sin embargo, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  tiene otras funciones fisiológicas causadas por su baja reactividad. A bajas concentraciones (por debajo de 10  $\mu\text{M}$ ) puede estimular la proliferación de algunos tipos celulares (Sigaud *et al.*, 2005) y participa en diversas vías de señalización celular (Groeger *et al.*, 2009).

### 2.1.2. Homocisteína

Por otro lado, existen moléculas que sin ser RL o ROS/RNS también pueden actuar como agentes oxidantes, como la homocisteína (HCY). La HCY es un aminoácido no proteico sintetizado a partir de la metionina, tras la pérdida del grupo metilo de su extremo carboxilo terminal. Sus efectos oxidantes se producen a partir de niveles mayores de 16  $\mu\text{M}$  en el plasma sanguíneo (Perna *et al.*, 2003) y están relacionados con enfermedades cardiovasculares, como un mayor riesgo de padecer infartos o eventos trombóticos, y más recientemente con enfermedades de discapacidad cognitiva, como la EA (Perna *et al.*, 2003; Garcia y Zanibbi, 2004; Tyagi *et al.*, 2005). Además, la HCY también puede inducir estrés oxidativo *in vitro*, a través de la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante reacciones catalizadas por metales, o produciendo peroxinitrito en presencia de óxido nítrico y  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Perna *et al.*, 2003).

## 2.2. AGENTES ANTIOXIDANTES

Para intentar contrarrestar los efectos de los agentes oxidantes, a lo largo de la evolución, se desarrollaron en los organismos los compuestos antioxidantes. Un compuesto antioxidante se define como cualquier sustancia que, a bajas concentraciones, comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato (Halliwell y Gutteridge, 1995). En los seres vivos, el sustrato oxidable es toda aquella molécula, orgánica o inorgánica, que se encuentra en las células, como las proteínas, los lípidos, los hidratos de carbono y el ADN. Según otros autores, un compuesto antioxidante también puede definirse como aquel compuesto que protege los sistemas biológicos frente a los efectos potencialmente perjudiciales de procesos o reacciones que causan excesivas oxidaciones (Krinsky, 1992).

Los antioxidantes pueden ser enzimáticos o no enzimáticos. Los primeros pueden actuar catalizando diferentes reacciones para eliminar o transformar los RL y las especies reactivas (antioxidantes primarios) y se encuentran principalmente en el citosol y la matriz mitocondrial. En este grupo se encuentran enzimas como la Cu/Zn superóxido dismutasa (SOD1), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GR). Además, también existen enzimas que se encargan de reparar *a posteriori* el daño generado que no ha podido evitarse con anterioridad (antioxidantes terciarios).

Por otro lado, los antioxidantes no enzimáticos (antioxidantes secundarios) engloban todas aquellas proteínas sin actividad catalítica y otras moléculas orgánicas

con propiedades antioxidantes, que generalmente actúan interceptando los RL. A su vez pueden diferenciarse en hidrofílicos y lipofílicos. Las primeras actúan en el citosol o la matriz extracelular, siendo las más relevantes el glutatión (GSH), el ácido ascórbico (vitamina C), el ácido úrico o la bilirrubina. Las segundas, suelen actuar en las membranas celulares, como el  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), los carotenoides, los flavonoides o las ubiquinonas. Muchos de estos antioxidantes pueden ser ingeridos en la dieta, pues están presentes en alimentos como la fruta o la verdura, y algunos como las vitaminas sólo pueden absorberse de esta manera por el organismo, dado que en los seres humanos no se sintetizan endógenamente.

### **2.3. ESTRÉS OXIDATIVO, ENVEJECIMIENTO Y PATOLOGÍAS ASOCIADAS**

El hecho de que el estrés oxidativo sea un tema tan importante para la ciencia hoy en día radica en que es un aspecto crucial de muchos procesos biológicos, no sólo patológicos, sino también naturales, como el envejecimiento. En la década de los 50, Denham Harman propuso la Teoría del Envejecimiento por Radicales Libres (Harman, 1956). Esta teoría propone que el envejecimiento de los seres vivos es una acumulación de daño oxidativo en el organismo, donde todas sus biomoléculas, hidratos de carbono, lípidos, proteínas y ADN, son susceptibles de sufrirlo. Este daño oxidativo desencadena una pérdida o disminución de su función, que afecta a las células y tejidos donde se encuentran, y que conllevan a que todo el organismo envejezca.

Sin embargo, desde que la teoría fue propuesta, han sido muchas las investigaciones realizadas que han intentando profundizar más en las posibles causas del envejecimiento. Y si bien hoy en día ésta sigue siendo una de las hipótesis más aceptadas, también ha sufrido algunas modificaciones a medida que la ciencia desvelaba nuevas características del proceso de envejecimiento. Como se ha comentado en el apartado 2.1. de la presente Tesis Doctoral, uno de los lugares donde existe una mayor generación de RL es la mitocondria (Figura 2). Por ello, se ha propuesto que el envejecimiento celular esté causado en mayor medida por los RL y ROS generados por la mitocondria, en la Teoría Mitocondrial del Envejecimiento Celular (Miquel *et al.*, 1980). Esta teoría sugiere que la senescencia es un producto derivado del ataque de los RL y ROS al genoma mitocondrial en células post-mitóticas. Las mitocondrias de las células post-mitóticas consumen oxígeno a velocidades altas, liberando entonces radicales de oxígeno que exceden la capacidad de las defensas antioxidantes celulares y generando daño oxidativo en las biomoléculas de la célula.

Por otro lado, otra teoría sobre el envejecimiento que ha cobrado gran relevancia en los últimos años es la Teoría del Acortamiento Telomérico. En ella, se postula que la mayoría de las células del organismo tienen un número de divisiones limitado por la longitud de los telómeros de sus cromosomas (Olovnikov, 1973). Los telómeros son unas secuencias de ADN específicas y repetidas que se localizan en los extremos de los cromosomas y cuyas funciones son muy variadas (Blackburn, 1991; Dashe *et al.*, 1997). Cada vez que la célula se divide, los telómeros se acortan y cuando éstos se agotan, la célula entra en senescencia y muere. Adicionalmente, el estrés oxidativo también afecta al acortamiento telomérico, pues el daño oxidativo generado se repara con menor eficiencia en estas zonas comparado con otras regiones cromosómicas, acelerando su pérdida (von Zglinicki, 2002).

Además, en algunas células, como las células germinales, células progenitoras o algunas líneas celulares sanguíneas se ha descrito la existencia de una enzima llamada telomerasa, que se encarga de regenerar la pérdida de secuencia de los telómeros (Bodnar *et al.*, 1998). Esta enzima también está relacionada con el estrés oxidativo, pues su deficiencia puede provocar un aumento del mismo (Pérez-Rivero *et al.*, 2008) o también puede actuar como protección frente a daño oxidativo en la mitocondria (Ahmed *et al.*, 2008). Sin embargo, en este último caso, perdería su función original y no evitaría el acortamiento telomérico (Ahmed *et al.*, 2008).

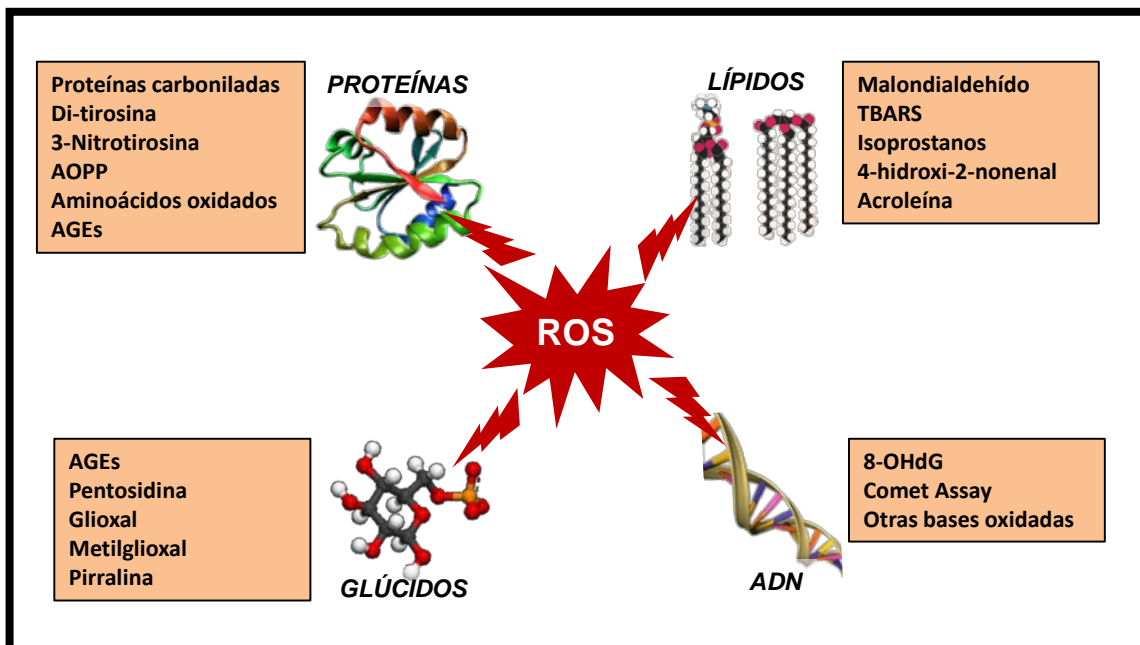
Por estos motivos, el hecho de que nuestro organismo envejezca y acumule daño oxidativo genera a la vez una mayor probabilidad de que se desarrollen patologías asociadas a estrés oxidativo. Por ello, enfermedades propias de la senescencia en las que se ha descrito una relación, causal o consecuente, con el estrés oxidativo son múltiples. Se ha observado en enfermedades tales como cataratas (Spector, 1995), aterosclerosis (Bonomini *et al.*, 2008), insuficiencia renal crónica (Oberg *et al.*, 2004), artritis reumatoide (Vasanthi *et al.*, 2009), y en enfermedades neurodegenerativas como enfermedad de Parkinson (Henchcliffe y Beal, 2008) o enfermedad de Alzheimer (Christen, 2000). Además, también existen síndromes relacionados con el envejecimiento a los que está asociado un elevado estrés oxidativo, como el síndrome de Down (Pallardó *et al.*, 2010).

## **2.4. BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO**

En el momento de analizar el estatus oxidativo de un individuo, como la vida media de los RL y ROS es muy corta, es preferible utilizar biomarcadores que sean productos secundarios de las reacciones producidas por los agentes oxidantes.

Según Lesko y Atkinson (2001), las características que debe tener un biomarcador son: 1) relevancia clínica, 2) especificidad y sensibilidad a los efectos de los tratamientos, 3) fiabilidad, 4) practicabilidad y 5) simplicidad. Algunos son indicadores de daño oxidativo a las biomoléculas, mientras que otros determinan las defensas antioxidantes frente al posible daño oxidativo (Dalle-Donne *et al.*, 2006; Niki, 2010).

Además, la medida de un biomarcador de manera aislada no es capaz de valorar de manera precisa y definitiva el estrés oxidativo para ser aplicado directamente a la clínica (Pryor y Godber, 1991), por lo que siempre es recomendable utilizar varios biomarcadores a la vez, de manera que se pueda tener una visión más amplia del estado redox del organismo. A continuación, se describen brevemente algunos de los biomarcadores más importantes en función de la biomolécula susceptible de sufrir el daño oxidativo (Figura 4):



**Figura 4. Biomarcadores de estrés oxidativo más importantes en función de la molécula que sufre el daño oxidativo.** AOPP: Productos avanzados de oxidación proteica (del inglés *Advanced Oxidation Protein Products*); TBARS: Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (del inglés *ThioBarbituric Acid-Reacting Substances*); AGEs: Productos finales de glicación avanzada (del inglés *Advanced Glycation End-products*); 8-OHdG: 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina.

- Biomarcadores de daño oxidativo a lípidos: cuando los lípidos sufren daño oxidativo se puede poner en peligro la integridad de las membranas celulares o perder una fuente de energía para el metabolismo celular. Existen diferentes metodologías para valorar el daño oxidativo a lípidos en el ser humano, bien de manera directa midiendo los hidroperóxidos lipídicos (Miyazawa *et al.*, 1994) o

de manera indirecta, valorando productos de esa peroxidación, como el malondialdehído (Wong *et al.*, 1987).

- Biomarcadores de daño oxidativo a proteínas: todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por RL, principalmente por OH<sup>•</sup>. La oxidación de las proteínas puede dar lugar a un cambio conformacional, que puede generar incluso la modificación o pérdida de su función biológica. Una de las maneras más comunes de cuantificar el daño oxidativo a proteínas es mediante la valoración de proteínas carboniladas (cantidad de grupos carboxilo oxidados; Levine *et al.*, 1990). Además, existen determinaciones de aminoácidos específicos que han sufrido una modificación tras sufrir daño oxidativo, como es el caso de la 3-nitrotirosina o la di-tirosina (Witko-Sarsat *et al.*, 1996).

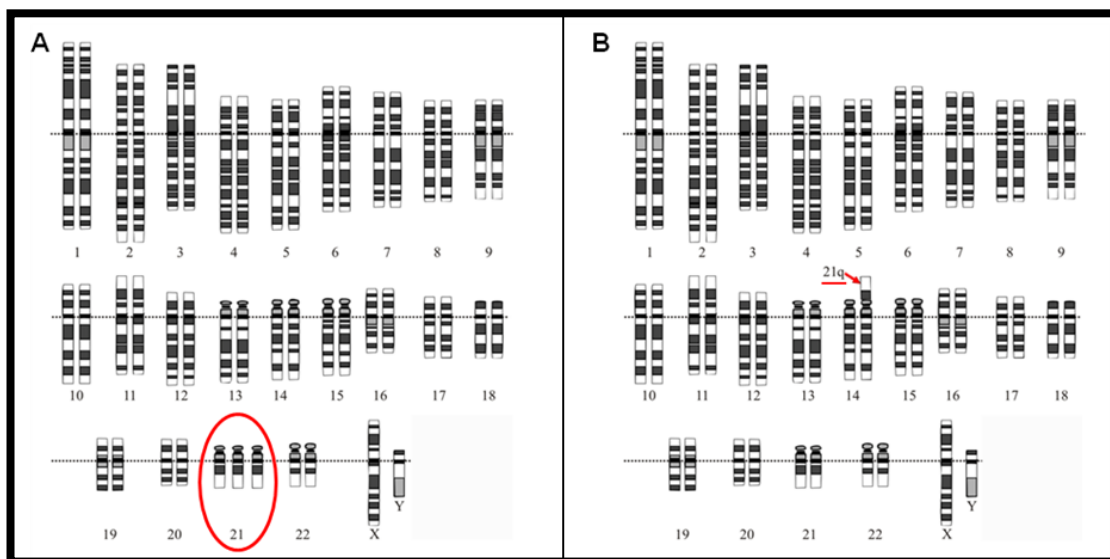
- Biomarcadores de daño oxidativo a glúcidos: los glúcidos (o hidratos de carbono) son la principal fuente de energía del organismo. Al someterse a un estrés oxidativo elevado sufren una glicoxidación, y son capaces de reaccionar con los grupos amino de las proteínas, dando lugar a los productos de glicación avanzada (AGEs). Al determinar los niveles de AGEs se puede tener una idea del daño oxidativo que sufren los glúcidos, aunque dado que pueden reaccionar con proteínas también es un indicador de daño oxidativo a éstas (Yanasigawa *et al.*, 1998).

- Biomarcadores de daño oxidativo a ADN: el ataque de RL y ROS al ADN puede provocar una alteración de la información genética ya que, a pesar de los sistemas de protección del ADN, existen evidencias de que está sometido continuamente al ataque de los mismos (Cadet *et al.*, 2010). De todos los productos de oxidación del ADN, la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) es la más estudiada, pues es el producto más abundante y es excretado por la orina (Loft *et al.*, 1992). Sin embargo, existe una metodología que es capaz de detectar el daño oxidativo al ADN en células individuales, normalmente células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Esta técnica se denomina electroforesis en gel de células aisladas (SCGE) o ensayo del cometa (Singh *et al.*, 1988). Tiene la ventaja de que es mucho más sensible y puede detectar diferentes tipos de daño al ADN, como roturas de hebra sencilla o lesiones específicas mediante el uso de enzimas reparadoras (Smith *et al.*, 2006), y por ello ha sido la técnica elegida para la determinación de daño oxidativo al ADN en la presente Tesis Doctoral.

### 3. SÍNDROME DE DOWN

El síndrome de Down (SD), o trisomía 21, es una de las alteraciones cromosómicas más comunes en la especie humana, con una incidencia estimada a nivel mundial de 1 por cada 700-1000 nacimientos vivos (Hook, 1981; Sherman *et al.*, 2007). Sin embargo, esta incidencia ha disminuido en España, pasando a ser de 1 por cada 1200 nacimientos, según datos de la Encuesta de Discapacidad, Autonomía Personal y Situaciones de Dependencia (EDAD) del año 2008, realizada por el Instituto Nacional de Estadística. Esta disminución en la incidencia del SD en la población española podría deberse tanto a las mejoras en el diagnóstico prenatal como a la legalización del aborto.

Los síntomas clínicos del SD fueron descritos por primera vez por el médico británico John Langdon H. Down en 1866 (Down, 1866), pero no fue hasta 1959 cuando el médico genetista francés Jérôme Lejeune y sus colaboradores establecieron la asociación entre el SD y una copia extra del cromosoma 21 (Lejeune *et al.*, 1959) (Figura 5). La trisomía del cromosoma 21 puede presentarse en tres formas diferentes, cada una con una frecuencia asociada (Hook, 1981; Sherman *et al.*, 2007):



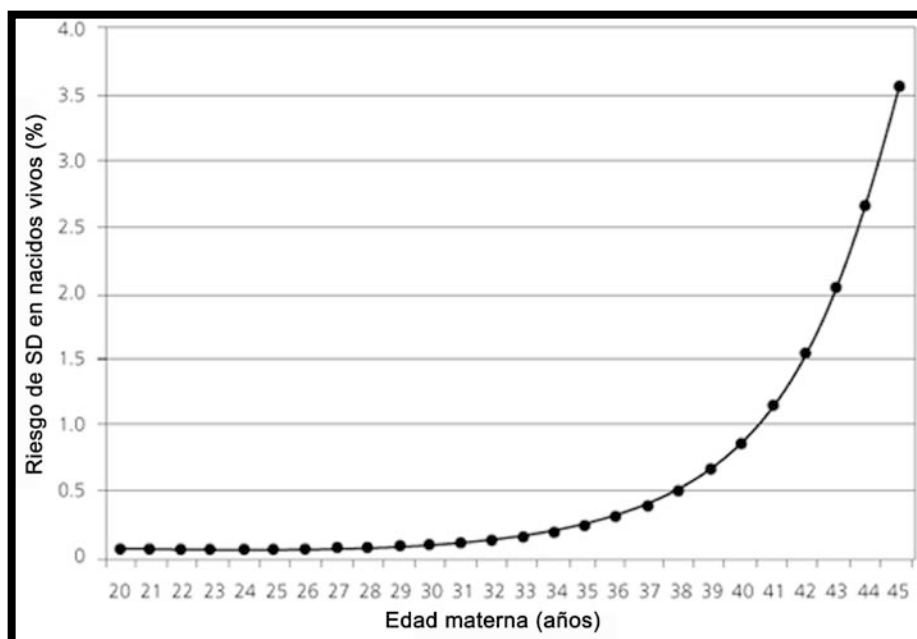
**Figura 5. Cariotipos de personas con SD.** A: varón con trisomía regular del cromosoma 21 (♂, 47, XY, +21). B: varón con translocación robertsoniana entre los cromosomas 14 y 21, der(14;21), originada por fusión céntrica de dichos cromosomas (♂, 46, XY, der(14;21)(q10;q10)).

- a) Trisomía regular: es la trisomía con mayor frecuencia en este síndrome (90-95% de los casos). Su origen reside en un error durante la formación de los gametos, en la primera división meiótica. De este modo, uno de los gametos que ha de transmitir la información genética tiene un cromosoma 21 extra. En el 85% de los casos el cromosoma

extra lo transmite el óvulo, mientras que en el 15% restante lo transmite el espermatozoide.

- b) Trisomía por translocación: aunque la persona tenga un complemento cromosómico diploide (46 cromosomas en total) tiene un fragmento del cromosoma 21 repetido, que suele unirse a un cromosoma del grupo D (13-15) o del grupo G (21-22), de manera que la información genética está por triplicado también. Este tipo de trisomía ocurre en un 2-6% en la población.
- c) Trisomía por mosaicismo: este tipo de trisomía se produce después de la concepción, de manera que no todas las células de la persona tienen una copia extra del cromosoma 21, sino sólo un porcentaje. En función del porcentaje de células trisómicas la severidad del síndrome será mayor o menor y es la forma de trisomía menos habitual, con un 2-4% de frecuencia en la población.

Dado que en la forma de trisomía más frecuente, el cromosoma 21 extra lo aporta el óvulo, el principal factor de riesgo para el desarrollo del síndrome en el feto es la edad materna (Snijders *et al.*, 1999; Newberger, 2000; Holding, 2002) (Figura 6). Sin embargo, estudios recientes han descubierto que algunos factores ambientales, como la píldora anticonceptiva en mujeres mayores, también podrían favorecer un error en la división meiótica (Ghosh *et al.*, 2011).



**Figura 6. Relación entre la edad materna y el riesgo de tener un hijo con SD.** Adaptada de Newberger (2000). Datos de Cuckle *et al.* (1987).



El diagnóstico del SD se puede hacer de diferentes maneras. Existe una prueba en sangre, que se realiza a las madres, en la que se puede establecer una sospecha diagnóstica. En ella, se analizan los niveles plasmáticos de alfa-fetoproteína (AFP), estriol y gonadotropina coriónica humana (hCG) (Cuckle *et al.*, 1984; Hersey *et al.*, 1986; Bogart *et al.*, 1987; Holding, 2002). En un alto porcentaje de los casos, se observa que niveles bajos de AFP y estriol, combinados con niveles altos de hCG, dan como resultado la aparición de SD en el feto (Haddow *et al.*, 1998). Además, existen otras pruebas prenatales, como el uso de marcadores de ultrasonidos (Nyberg *et al.*, 2001) o el análisis del material genético del feto. Estas últimas se basan en la amniocentesis o la biopsia de vellosidades coriónicas (Newberger, 2000), pero ambas podrían implicar cierto riesgo para la madre y/o su hijo, pudiendo producirse el aborto en el 2% de los casos.

Las personas con SD tienen unos rasgos fenotípicos muy característicos, que se presentan en grado variable dentro de la población. Suelen tener baja estatura, obesidad, epicanto bilateral, pelvis y orejas displásicas, surco simiesco, boca y nariz pequeñas y occipucio plano. Además de los rasgos físicos, el SD es una de las principales causas de retraso mental, y también tiene asociados otros desórdenes fisiológicos, como hipotonía, retraso en el crecimiento, alteraciones en el sistema inmune, problemas digestivos, defectos congénitos cardiacos, estrés oxidativo elevado, disfunciones tiroideas o mayor predisposición a padecer leucemia (Korsager *et al.*, 1978; Casado *et al.*, 2007; Hasle *et al.*, 2000). Por último, otra característica muy importante es que estas personas sufren un envejecimiento prematuro, presentando una mayor frecuencia de patologías asociadas con la edad, como cataratas (van Buggenhout *et al.*, 1999), osteoporosis o la aparición temprana de demencias de tipo Alzheimer (Bush y Beail, 2004). De hecho, entre el 10-25% de personas con SD entre 40-49 años, y entre el 20-55% de personas con SD entre 50-59 años acaban desarrollando la EA (van Dyke *et al.*, 1998). A continuación se describen los aspectos del SD que se consideraron relevantes para su estudio en la presente Tesis Doctoral.

### **3.1. ESTRÉS OXIDATIVO EN SD**

Una de las características del SD es el elevado estrés oxidativo que presentan las personas que padecen el síndrome. Este incremento del estrés oxidativo se debe, probablemente, a un exceso de actividad de la enzima SOD1. Esta enzima está codificada por el gen *SOD1*, situado en el brazo largo del cromosoma 21 (región 21q22.1). De este modo, la expresión de este gen y la actividad de la SOD1 están

incrementadas en aproximadamente un 50% (Annerén y Edman, 1993; de la Torre *et al.*, 1996).

La SOD1 está localizada en el citosol celular y en el espacio intermembrana mitocondrial (Okado-Matsumoto y Fridovich, 2001) y cataliza la dismutación del  $O_2^{\bullet -}$  a oxígeno y  $H_2O_2$  (Figura 7). El  $H_2O_2$  generado se descompone por la acción de las enzimas GPx y CAT. En el SD, debido al exceso de SOD1, el ratio SOD1/(GPx+CAT) estaría aumentado, dando lugar a una acumulación de  $H_2O_2$  no metabolizado. La citotoxicidad de este compuesto se basa en su capacidad para reaccionar con otras biomoléculas, vía reacción de Fenton o de Haber-Weiss (ver apartado 2.1. de la Introducción, Figura 3), dando lugar al  $OH^{\bullet}$ , más dañino para las biomoléculas.

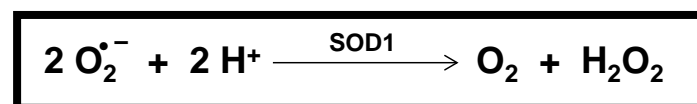


Figura 7. Mecanismo de acción de la SOD1.

Esta sobreexpresión del gen *SOD1*, debida a un efecto de dosis, puede perturbar el equilibrio de las ROS en las células, causando daño oxidativo en moléculas biológicas importantes, tales como ADN, proteínas y lípidos (ver apartado 2.4. de la Introducción) (Casado *et al.*, 2007; Campos *et al.*, 2011a, 2011b). Además, como se ha comentado anteriormente, el estrés oxidativo aumentado también está estrechamente ligado con el envejecimiento (Harman, 1956), pudiendo tener un papel fundamental en el envejecimiento prematuro presente en SD.

### 3.2. ENVEJECIMIENTO EN SD

La esperanza de vida en personas con SD ha aumentado considerablemente en las últimas décadas, pasando de 12 años en 1949 a 35 años en 1982 (Bittles y Glasson, 2004) y a 55 años o más en la actualidad (Barnhart y Connolly, 2007). Además, existen expectativas de que esta esperanza de vida siga aumentando en los próximos años (Bittles y Glasson, 2004), y ya se ha descrito algún caso en el que una persona con SD alcanzó la década de los 80 (Chicoine y McGuire, 1997).

Este aumento en la esperanza de vida de las personas con SD se debe, además de a las causas mencionadas para el envejecimiento poblacional global (mejora en cuidado sanitario e investigación), a una mejor información e intervención educativa para conseguir mejorar su calidad de vida (Roizen y Patterson, 2003). Aun

así, su esperanza de vida sigue siendo menor que en la población general y que poblaciones con discapacidad intelectual que no son SD (Glasson *et al.*, 2002).

El envejecimiento es un proceso natural que implica cambios físicos y fisiológicos que pueden dar lugar a la pérdida de diferentes funciones biológicas en las personas. Una de las características del SD es el envejecimiento prematuro, que implica varios cambios en diferentes aspectos físicos y fisiológicos, como por ejemplo: pérdida de pelo y aparición precoz de canas y arrugas en la piel (Lott y Lai, 1982), aparición temprana de la menopausia en las mujeres (Coppus *et al.*, 2010), deficiencias en el oído y la vista (Van Buggenhout *et al.*, 1999), mayor riesgo de desarrollar patologías tiroideas (Korsager *et al.*, 1978), o la citada aparición de EA (Bush y Beail, 2004). Hay que destacar que los relativamente elevados porcentajes de aparición de EA que muestran las personas con SD (van Dyke *et al.*, 1998) son el principal nexo de unión entre ambos desórdenes y uno de los motivos por los que se haya escogido una población de cada tipo para la realización de esta Tesis Doctoral. Además, en relación con el envejecimiento prematuro del SD, también se ha descrito que el acortamiento telomérico, relacionado en gran medida con el envejecimiento (Shammas, 2011), se produce antes en personas con SD (Vaziri *et al.*, 1993).

### **3.3. FUNCIÓN RENAL EN SD**

Los problemas en la función renal están asociados al SD desde las etapas de diagnóstico prenatal. Está descrito que la pielectasia renal (dilatación de las pelvis renales), asociada a otras alteraciones visibles mediante ecografía, aumenta en 19 veces el riesgo de que el feto nazca con SD, además de aumentar la posibilidad de que éste sufra uropatía postnatal (Wickstrom *et al.*, 1996).

Hace aproximadamente 50 años, Berg *et al.* (1960) observaron por primera vez malformaciones renales en SD. Unos años más tarde, Coburn *et al.* (1967) describían que las personas con SD podrían tener una función renal dañada. Detectaron un aumento de la creatinina (Cr) en el plasma y un menor aclaramiento de Cr en la orina, y postularon que la filtración glomerular podría estar afectada en SD. Sin embargo, el número de trabajos que han aparecido sobre la función renal en SD desde entonces es relativamente escaso, comparado con aquellos que estudian otras funciones que pueden estar alteradas en el síndrome. Además, muchos de ellos son trabajos con un número muy bajo de individuos (Nishida *et al.*, 1979; Gupta *et al.*, 1991; Handel *et al.*, 2003; Said *et al.*, 2012), con un rango de edad pequeño (Ebert *et al.*, 2008) o con ambas limitaciones a la vez, pues son casos clínicos de una sola persona,

comúnmente de edad infantil (Takemura *et al.*, 1993; Proesmans *et al.*, 1995; Robson *et al.*, 1995; Al-Hermi *et al.*, 1999; Ramage *et al.*, 2002).

El número de anomalías detectadas es bastante diverso, pudiendo verse afectados los glomérulos o el tracto urinario. Según Mercer *et al.* (2004), las anomalías renales más comunes son la hipoplasia renal, la uropatía obstructiva y los microquistes glomerulares. Sin embargo, aún no está del todo claro si el daño en la función renal es algo característico del síndrome o son casos aislados. Incluso, hay algún trabajo en el que se describe que su incidencia en la población es bajo (Málaga *et al.*, 2005) o que no existe una relación entre SD y malformaciones congénitas asociadas a la función renal (Källén *et al.*, 1996).

Por otro lado, según un reciente estudio (Satgé *et al.*, 2009), las personas con SD parece que tienen menos riesgo a padecer cáncer de vejiga o de riñón. Estos autores postulan que algunos genes localizados en el cromosoma 21 podrían tener un efecto protector frente a este tipo de cáncer, aunque el trabajo se basa en observaciones de datos de mortalidad e incidencia de cáncer en esta población sin aportar ensayos *in vitro* o *in vivo*, por lo que sería necesario realizar más estudios al respecto para corroborar esta afirmación.

Por estos motivos, y porque los estudios realizados hasta la fecha no incluyen personas con SD de edad avanzada, se decidió analizar dentro de la muestra poblacional de esta Tesis Doctoral si la función renal de estas personas podría estar alterada, sobre todo en relación con el envejecimiento.

### **3.3.1. Marcadores de función renal.**

Es conocido que dos de los indicadores de función renal más útiles son la Cr urinaria y la gravedad específica (GE) (Voinescu *et al.*, 2002; Nyman *et al.*, 2006). La Cr es un producto final endógeno del metabolismo de la creatina. Es un compuesto nitrogenado orgánico no proteico, que se forma tras la deshidratación espontánea de la creatina y fosfo-creatina en el músculo. La Cr es excretada del cuerpo por los riñones, principalmente mediante filtración glomerular y en menor medida por secreción activa desde la sangre a través de los túbulos renales (Boeninger *et al.*, 1993). Debido a que es un producto final del metabolismo muscular, también se usa como indicador de la masa muscular de un individuo (Keshaviah *et al.*, 1994) o como parámetro de ajuste de dilución urinaria, pues su tasa de excreción es constante a lo largo del día (Crim, 1976).

La GE urinaria es una medida del ratio entre la densidad de la orina y la densidad del agua, de donde se puede inferir la cantidad de metabolitos que contiene. Además, no sólo se utiliza para determinar la función renal, sino también para determinar el estado de hidratación de un individuo (Kavouras, 2002). Asimismo, es un método rápido, sencillo y económico para estimar la capacidad de concentración o dilución de los riñones (Voinescu *et al.*, 2002)

Por otro lado, el uso de marcadores en orina supone una ventaja para el investigador, pues la recogida de la muestra es más fácil, existe un menor riesgo de contaminación y sobre todo es una técnica no invasiva. Este último motivo cobra especial relevancia en los estudios de SD, porque evita cualquier molestia a los integrantes del estudio. Por último, cabe destacar que aunque sería recomendable el uso de orina de 24 horas, muchas veces la muestra se encuentra incompleta, por lo que el resultado puede quedar sesgado. Por ello, es preferible utilizar muestras de orina puntuales sin riesgo de perder fiabilidad en los datos (Campos *et al.*, 2011). Por estos motivos se utilizó la orina de primera hora de la mañana como matriz biológica para la población de estudio en la presente Tesis Doctoral.

### **3.4. FUNCIÓN TIROIDEA EN SD**

La glándula tiroides es una glándula neuroendocrina que está situada sobre la tráquea y es la encargada de la producción de las hormonas tiroideas: tiroxina ( $T_4$ ) y triyodotironina ( $T_3$ ). La  $T_4$ , el producto de secreción primario del tiroides, es relativamente inactivo y es convertido a la forma activa  $T_3$  por la enzima tiroxina 5'-deiodinasa. Por otro lado, la producción de estas hormonas está regulada desde la hipófisis a través de la hormona estimulante de la tiroides (TSH), mediante una retroalimentación negativa para mantener unos niveles constantes de hormonas tiroideas en el organismo.

Ya a finales del siglo XIX, se relacionó el buen funcionamiento del tiroides con un desarrollo normal del cerebro (Ord, 1898). Adicionalmente, las hormonas tiroideas no son sólo cruciales para la maduración y funcionalidad del sistema nervioso central, sino que también tienen otros efectos relacionados con el desarrollo, el crecimiento y el metabolismo (Brent, 1994).

Por ello, las manifestaciones clínicas que se observan en un exceso o deficiencia de la hormona tiroidea son el reflejo de las múltiples acciones que realiza en el organismo. En la Tabla 2 se muestran los tres tipos de patologías relacionadas

con el tiroides, dependientes de los niveles de las hormonas tiroideas y de los niveles de TSH en sangre.

**Tabla 2. Tipos de patologías asociadas al tiroides y su relación con los niveles sanguíneos de hormonas tiroideas y TSH.**

Patología	Niveles de TSH	Niveles de $T_4$ y $T_3$
<i>Hipertiroidismo</i>	Bajo	Alto
<i>Hipotiroidismo</i>	Alto	Bajo
<i>Hipotiroidismo subclínico</i>	Alto	Normal

En SD, se ha descrito que la prevalencia de disfunción tiroidea en niños puede llegar al 30% (van Allen *et al.*, 1999), siendo la mayoría de los casos de hipotiroidismo (Tüysüz y Beker, 2001). Asimismo, los adultos tienen riesgo de sufrir tanto hiper- como hipotiroidismo a medida que envejecen, pero el hipotiroidismo sigue siendo la afectación más común, pudiendo llegar al 40% de la población con SD (Barnhart y Connolly, 2007).

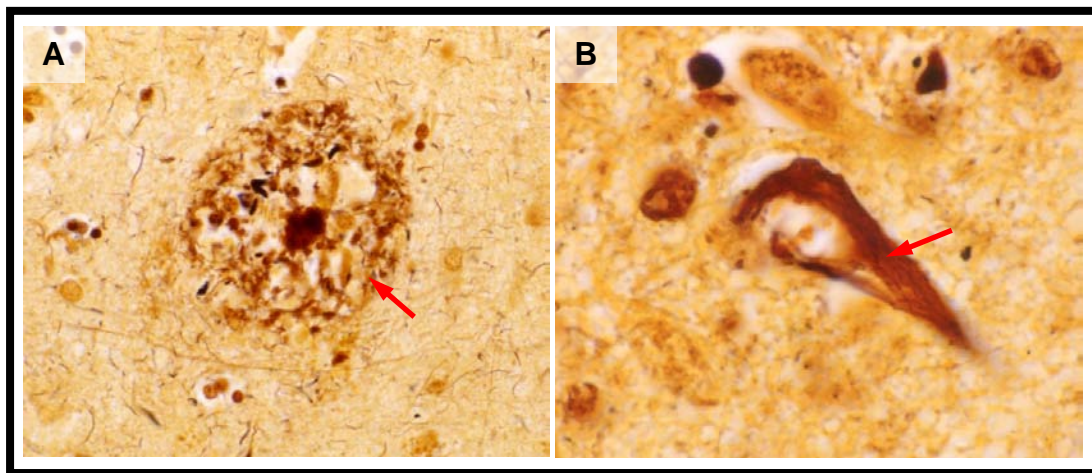
El hipotiroidismo no tratado puede llevar a síntomas que mimetizan con un declive de las funciones cognitivas, por lo que se podría dar un diagnóstico erróneo de EA en estos individuos (Smith, 2001). Actualmente, el hipotiroidismo es tratado con la administración de la hormona tiroidea sintética (L-tiroxina) para que reemplace los niveles bajos observados en esta patología, obteniendo resultados satisfactorios en neonatos (van Trotsenburg *et al.*, 2005). Además, también se ha recomendado su uso para el caso del hipotiroidismo subclínico, si bien aún hay opiniones discordantes al respecto (Toscano *et al.*, 2003).

#### 4. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La EA es la causa más común de demencia. A principios del siglo XX, el médico alemán Alois Alzheimer describió por primera vez los síntomas clínicos de la enfermedad, así como su asociación a las alteraciones de las células del cerebro (Alzheimer, 1907). De este modo, dio nombre al trastorno neurodegenerativo

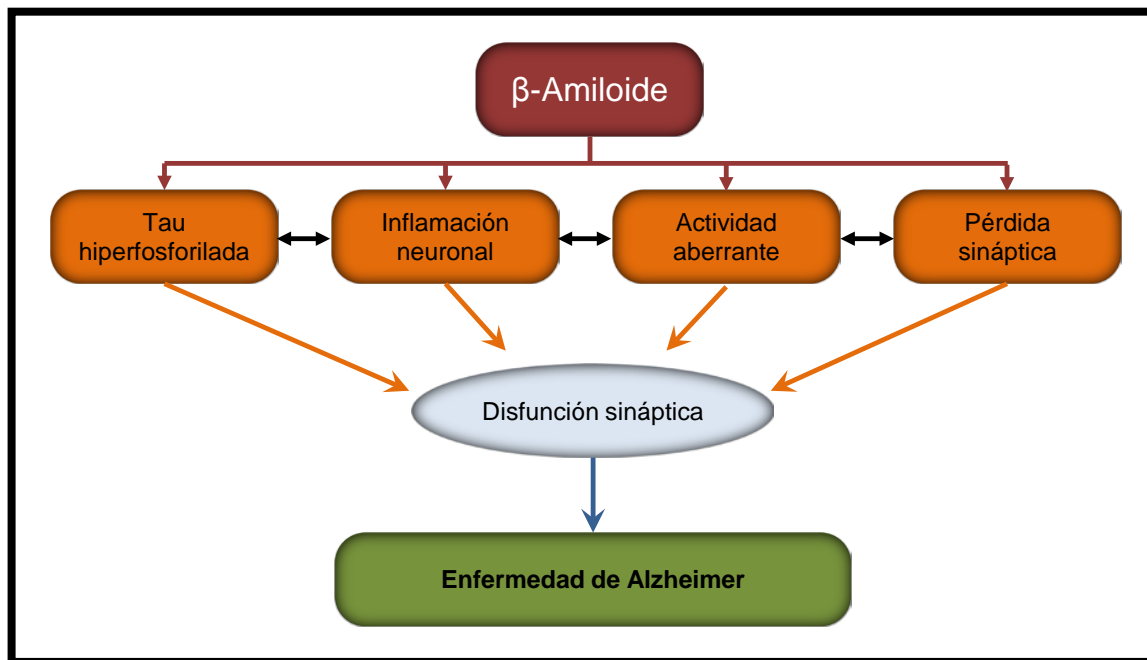
progresivo causante de la demencia más común entre individuos de mediana y avanzada edad.

La EA da lugar a un deterioro cognitivo generalizado y a trastornos de conducta en la persona. La enfermedad cursa con una pérdida de memoria, de lenguaje y de otras cualidades mentales, incapacitando al paciente a hacer razonamientos y a resolver problemas y, en algunos casos, provoca síntomas psicóticos, como paranoia y alucinaciones. Su duración media suele ser, aproximadamente, de diez años, aunque puede variar de un paciente a otro. Las principales manifestaciones físicas ocurren en el cerebro, donde aparecen las llamadas placas seniles y los ovillos neurofibrilares (Schaeffer *et al.*, 2011) (Figura 8).



**Figura 8. Principales manifestaciones físicas de la EA** (marcadas con flechas rojas). **A.** Placas seniles. **B.** Ovillos neurofibrilares. Ambas imágenes fueron tomadas a 100 aumentos y provienen de cortes histológicos de tejido cerebral de pacientes con EA. Adaptada de Marcus y Jacobson (2003).

Las placas seniles se forman por la acumulación, alrededor de las células del cerebro, del péptido  $\beta$ -Amiloide ( $A\beta$ ). Este péptido se forma tras el procesamiento de una proteína precursora de mayor tamaño, conocida como la proteína precursora amiloide (APP) tras la acción de  $\beta$ -secretasas y  $\gamma$ -secretasas (Selkoe, 2003). El  $A\beta$  producto de la acción de estas enzimas tiene entre 39 y 43 aminoácidos, siendo las formas más comunes la de 40 y la de 42 aminoácidos ( $A\beta_{40}$  y  $A\beta_{42}$ , respectivamente). Se ha descrito que la acumulación de  $A\beta$ , causada por problemas en el metabolismo de la APP, es el evento más importante para la neurodegeneración en individuos con EA. Es la llamada Hipótesis de la Cascada Amiloide (Hardy y Allsop, 1991; Hardy y Higgins, 1992) (Figura 9).



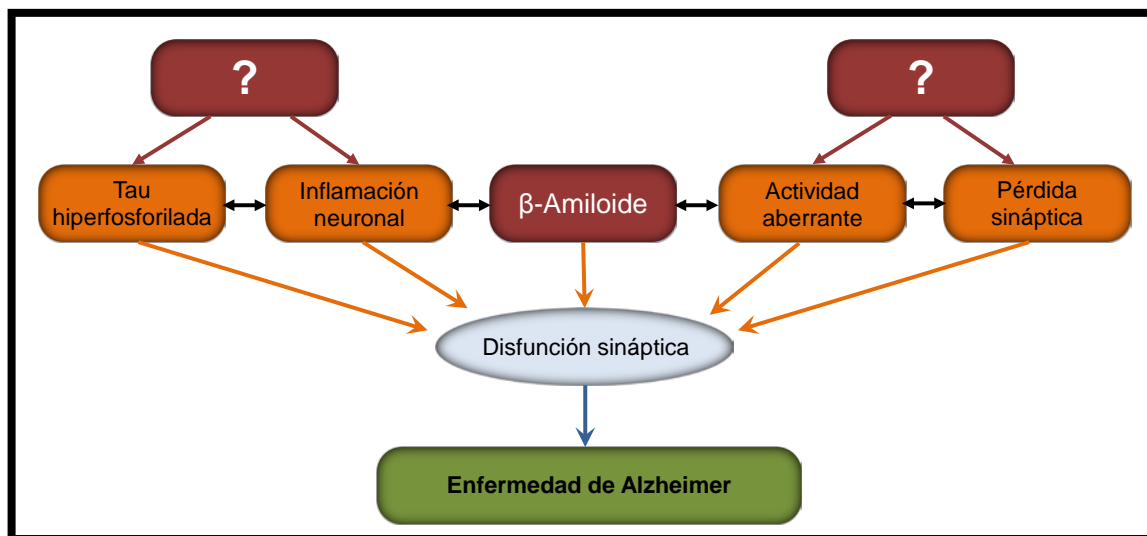
**Figura 9. Hipótesis de la Cascada Amiloide.** Adaptada de Pimplikar (2009).

Según esta hipótesis, como consecuencia de la aparición de las placas seniles, empiezan a formarse dentro de las neuronas los ovillos neurofibrilares. Estos ovillos neurofibrilares contienen elevadas cantidades de proteína Tau, que se encuentra hiperfosforilada y formando agregados. La proteína Tau es una proteína asociada a los microtúbulos, cuya función es promover el ensamblaje y la estabilidad de los mismos en las células neuronales (Selkoe, 2003). La acumulación en forma de ovillos de esta proteína hiperfosforilada en las neuronas lleva a la degeneración y muerte neuronal (Iqbal y Grundke-Iqbal, 2006), ocasionando los síntomas clínicos de la EA.

Sin embargo, en la actualidad se está discutiendo si la Hipótesis de la Cascada Amiloide es del todo cierta. Existen estudios en los que se observa que el grado de acumulación de las placas seniles no se corresponde con el grado de demencia (Terry *et al.*, 1991). También se ha descrito que en modelos murinos de EA la acumulación de A $\beta$  se produce meses después de observar déficits de memoria (Lesne *et al.*, 2008). Además, en estudios donde se usaban técnicas de neuroimagen *in vivo* de tomografía por emisión de positrones (PET) se ha observado la presencia de placas seniles en individuos cognitivamente normales (Villemagne *et al.*, 2008). Por último, recientes ensayos clínicos con pacientes han demostrado que no todas las aseveraciones de la hipótesis son ciertas u ocurren en todos los pacientes con EA (Reitz, 2012).



Estas discrepancias pueden deberse a que aún no se conoce con precisión qué tipo de agregados de A $\beta$  son los que tienen efectos tóxicos. Algunos estudios indican que puede ser la relación entre el fragmento de A $\beta$  de 42 residuos y el fragmento A $\beta$  de 40 residuos la que inicie el desarrollo de la enfermedad (Bentahir *et al.*, 2006). Por otra parte, cada vez son más frecuentes los estudios donde describen que los agregados solubles de A $\beta$  (oligómeros) pueden ser agentes patogénicos causantes de la EA (Glabe, 2005; Walsh y Selkoe, 2004; 2007). Por todo ello, se ha propuesto una revisión de la hipótesis, donde el A $\beta$  jugaría un papel muy importante en la enfermedad, pero no sería el principal responsable de la misma (Figura 10).



**Figura 10. Revisión de la Hipótesis de la Cascada Amiloide.** Adaptada de Pimplikar (2009).

El principal factor de riesgo de la EA es la edad avanzada. Por ello, debido al progresivo envejecimiento poblacional que existe, la incidencia de la EA se ha visto aumentada en las últimas décadas. Según datos de la encuesta EDAD del año 2008, realizada por el Instituto Nacional de Estadística, en España padecen la EA una persona por cada 60 personas mayor de 60 años. Si observamos su prevalencia en cuanto a sexos, se puede afirmar que ésta es superior en mujeres, con un caso de cada 45 mujeres mayor de 60 años, mientras que en varones es de uno por cada 100 hombres mayor de 60 años. Además, su prevalencia aumenta en edades más avanzadas, alcanzando el 40% en las personas mayores de 80 años, y constituye la décima causa de mortalidad en España.

El diagnóstico de la EA se realiza hoy en día mediante examen neurológico, cuestionarios neuropsicológicos e imágenes tomadas del cerebro de pacientes. Los parámetros utilizados para predecir la EA atienden a las recomendaciones del Instituto americano de enfermedades neurológicas, cognitivas e infarto y de la Asociación de

Alzheimer y enfermedades relacionadas (NINCDS-ADRDA) que fueron establecidos en 1984 por McKhann y sus colaboradores (Tabla 3).

**Tabla 3. Criterios diagnósticos para la EA según el NINCDS-ADRDA.** Adaptada de McKhann *et al.* (1984).

CRITERIOS PARA EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE POSIBLE EA
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Demencia con variaciones en su inicio, en la presentación o en el curso clínico, inusuales en la EA, pero para la que no hay explicación alternativa.</li> <li>2. Presencia de un trastorno secundario sistémico o cerebral capaz de producir demencia del enfermo.</li> <li>3. Existencia de un déficit gradual progresivo de las funciones cognitivas.</li> </ol>
CRITERIOS PARA EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE PROBABLE EA
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Déficit cognitivo demostrado mediante examen clínico y documentado con tests y escalas validados.</li> <li>2. Déficit en dos o más áreas cognitivas (memoria, juicio, cálculo, etc.).</li> <li>3. Empeoramiento PROGRESIVO de la memoria y de otras funciones cognitivas.</li> <li>4. Ausencia de trastornos de la conciencia (delirium).</li> <li>5. Inicio entre los 40 y 90 años.</li> <li>6. Sin evidencia de otras enfermedades cerebrales o sistémicas que pudiesen justificar el cuadro.</li> </ol> <p>Apoyan el diagnóstico de EA probable:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>7. Presencia de afasia, apraxia, agnosia.</li> <li>8. Alteración de patrones de conducta e incapacidad para realizar tareas cotidianas</li> <li>9. Historia familiar.</li> <li>10. Exámenes complementarios: líquido cefalorraquídeo normal, enlentecimiento inespecífico o anormalidad en el electroencefalograma, y signos de atrofia cerebral progresiva en estudios seriados de TAC cerebral.</li> </ol>
CRITERIOS PARA EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO DEFINITIVO EA
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Cumplir los criterios clínicos de EA probable.</li> <li>2. Evidencias histopatológicas obtenidas por biopsia o necropsia.</li> </ol>

Además de estos criterios, se realiza un diagnóstico neuropsicológico de demencia, basado en pruebas tomografía axial computerizada (TAC), pruebas de resonancia magnética nuclear (RMN), pruebas de PET, electroencefalogramas, etc. que ayudan a descartar otras causas de deterioro mental y otras demencias.

Sin embargo, con todas estas pruebas y criterios, el nivel de precisión del diagnóstico de la EA *in vivo* sólo puede aproximarse a “probable”. En la actualidad, la única forma de tener un diagnóstico definitivo de EA es el estudio del cerebro de los pacientes *post mortem*, donde se pueden detectar las placas seniles y los ovillos neurofibrilares (Chui *et al.*, 1993). No obstante, la investigación en técnicas diagnósticas está dando sus frutos, y ya existen estudios en los que se describe el uso de medicamentos que, en combinación con técnicas de imagen, podrían permitir la

detección de la EA con antelación (Barthel *et al.*, 2011a; 2011b; Barthel y Sabri, 2011; Herholz y Ebmeier, 2011). Además, también se ha descrito que cierta combinación de biomarcadores en el líquido cefalorraquídeo podría utilizarse en el diagnóstico de la enfermedad (Craig-Schapiro *et al.*, 2011; Mattsson *et al.*, 2012).

Previo al estadio de enfermedad, aparece el deterioro cognitivo leve (DCL) en el que se ven alteradas una o varias funciones cognitivas pero no es calificado como demencia. Sin embargo, se estima que el 55% de los casos con DCL manifiesta en un plazo de aproximadamente 4,5 años la EA (Ávila *et al.*, 2004).

La manera de clasificar la EA en la actualidad responde a criterios arbitrarios en función de la edad de diagnóstico. Si la enfermedad aparece después de los 65 años se diagnostica como EA de aparición tardía, y representa la gran mayoría de los casos. Este tipo de EA es de etiología compleja, dado que atiende a una suma de factores ambientales y genéticos que, tomados de manera aislada, no serían suficientes para desarrollar la enfermedad. Aun así, se han descrito algunos genes como factores de riesgo para el desarrollo de este tipo de EA, como el gen *APOE* (gen de la apolipoproteína E, situado en el cromosoma 19) (Corder *et al.*, 1993). Además, se han propuesto otros muchos genes candidatos a participar en el desarrollo de la EA tardía, si bien su implicación aún es incierta (Rocchi *et al.*, 2003). Es probable que en este tipo de EA, algunos de estos factores genéticos interactúen de manera sinérgica con los factores ambientales dando lugar a la aparición de la enfermedad, tal y como ocurre en otras enfermedades relacionadas con la edad con un componente genético, como la diabetes o el cáncer (Tanzi, 1999).

Por otro lado, cuando la EA se diagnostica en personas menores de 65 años, se habla de EA de aparición precoz o presenil. Se ha descrito que la EA precoz es de tipo familiar, con un patrón de herencia mendeliana, y representa entre el 1-5% de los casos (Shastri y Giblin, 1999). En su desarrollo y herencia están relacionados tres genes: el gen *APP* (gen de la APP, situado en el cromosoma 21), *PS-1* (gen de la proteína presenilina-1, en el cromosoma 14) y *PS-2* (gen de la proteína presenilina-2, en el cromosoma 1) (Schellenberg, 1995). En relación a la EA de tipo hereditario, se ha publicado un estudio reciente en el que se postula que se podría llegar a predecir este tipo de EA con más de 20 años de antelación, usando diferentes marcadores de líquido cefalorraquídeo, acumulación de A $\beta$  y seguimiento del metabolismo cerebral (Bateman *et al.*, 2012), si bien los autores indican que son necesarios estudios longitudinales para confirmar sus hipótesis.

#### 4.1 MODELOS DE ESTUDIO EN EA

El conocimiento de la EA ha avanzado, en gran medida, debido a las investigaciones en tejido cerebral obtenido de autopsias de pacientes que sufrieron la enfermedad. Sin embargo, este tipo de estudios limitan la capacidad de analizar las causas de la neurodegeneración, tanto a nivel celular como molecular. Asimismo, pueden existir eventos aislados, inespecíficos, no relacionados con el desarrollo de la EA que den falsa información sobre las consecuencias de la enfermedad en el cerebro de los afectados. Por este motivo, desde hace años las investigaciones se centran en el uso de modelos *in vivo* e *in vitro*, permitiendo grandes avances en el conocimiento de algunos aspectos de la enfermedad.

Los modelos *in vivo* se basan en animales de experimentación, donde las características de la EA pueden reproducirse en mayor o menor grado. Tradicionalmente los modelos murinos son los más usados, debido a su disponibilidad, dimensiones, bajo costo, fácil manejo y alta tasa de reproducción. Estos modelos son capaces de reproducir algunos aspectos de la EA, como cambios bioquímicos o histopatológicos (acumulación de A $\beta$  y/o presencia de proteína Tau hiperfosforilada), observándose pérdida neuronal y sináptica, y déficits en la memoria, en el conocimiento, en la función global, comportamiento y actividades rutinarias. Sin embargo, para conseguir estos modelos murinos hace falta modificar genéticamente a los animales, pues estos no desarrollan de manera “natural” la EA. Se han empleado animales con mutaciones en la APP, la proteína Tau o las presenilinas, pero en ninguno de estos modelos se ha mostrado la agregación de la proteína Tau en los típicos ovillos neurofibrilares, ni una pérdida significativa de cuerpos neuronales (Hock y Lamb, 2001). Además, debido a su corto tiempo de vida (no más de dos años), es difícil hacer un seguimiento temporal extenso, pues el desarrollo de la EA requiere de más tiempo. Por todo ello, el mayor beneficio generado por el uso de modelos murinos ha sido la caracterización de la expresión de genes implicados con mayor o menor seguridad en la EA y la posibilidad de estudiar algunas aproximaciones terapéuticas (Jami, 1988; Duff y Suleman, 2004).

Dado que los modelos murinos no desarrollan fielmente todas las alteraciones propias de la EA, se han propuesto otros modelos animales que sí pueden llegar a desarrollar todos los síntomas típicos de la enfermedad. De este modo, se podría establecer una jerarquía *in vivo* de los eventos más relevantes (causales y consecuentes), además de permitir estudiar la enfermedad desde su inicio, y poder probar nuevas terapias, comprobando sus efectos en cada fase de la patología. Estos

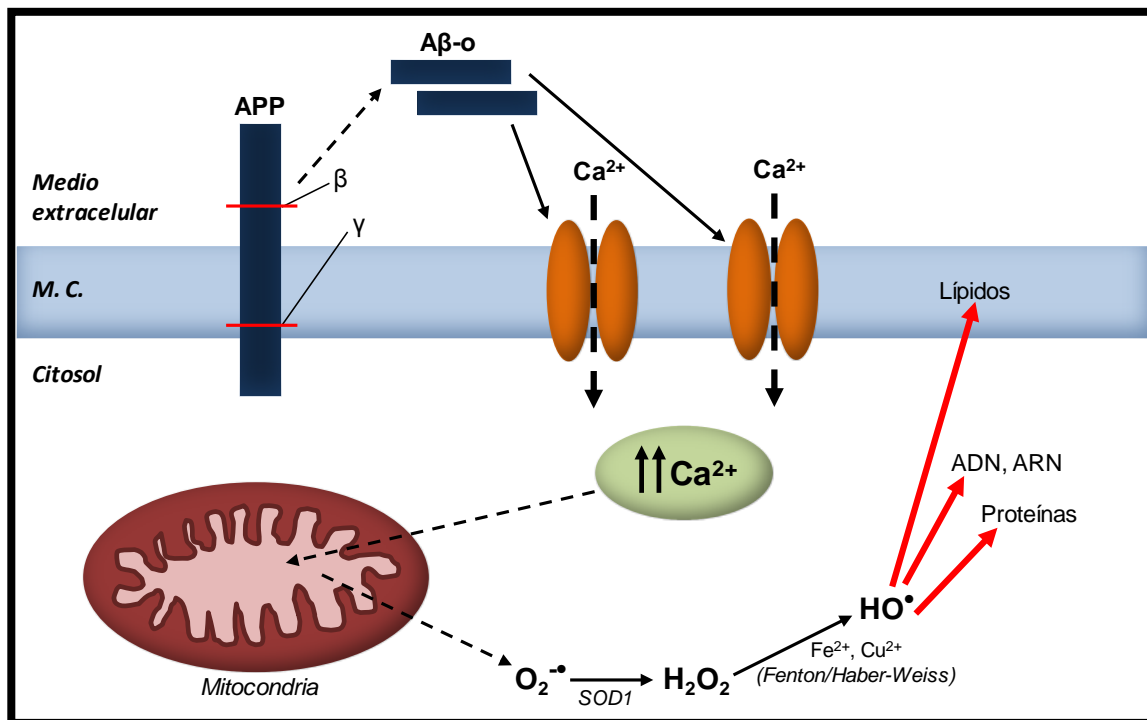
modelos se centran sobre todo en embriones de pollo y perros (Carrodegua *et al.*, 2005; González-Martínez *et al.*, 2011), aunque también se han propuesto otras especies como conejos, delfines o primates (Sarasa y Pesini, 2009).

Por otro lado, los modelos de EA *in vitro* se centran en la investigación en líneas celulares en las que se pueden investigar las causas de la enfermedad, su desarrollo, los mecanismos moleculares e incluso probar aproximaciones terapéuticas. Existen modelos de estudio sobre líneas celulares neurales donde, por ejemplo, se han propuesto nuevos genes asociados a la EA (Martínez-García *et al.*, 2010), se ha profundizado en la función de los oligómeros de A $\beta$  (Lacor *et al.*, 2007) o se ha estudiado el papel de la apoptosis (muerte celular programada) en relación con la enfermedad (Calissano *et al.*, 2009).

Además, una estrategia alternativa y complementaria es el uso de tejidos periféricos de pacientes con EA. Numerosas evidencias experimentales hacen pensar que la EA, como otras enfermedades del sistema nervioso, puede manifestarse a nivel sistémico, aunque sus repercusiones clínicas sean de menor grado (Eckert *et al.*, 1994; Gibson y Huang, 2002; Nagy *et al.*, 2002). El uso de células extraneurales ofrece ventajas comunes a otros modelos celulares y, además, permite la posibilidad de estudiar procesos patológicos a cualquier nivel de progresión de la enfermedad. La utilización de células extraneurales, como las células mononucleares de sangre periférica: monocitos y linfocitos (CMSP), plaquetas y fibroblastos (Etcheberrygaray e Ibarreta, 2001) ha permitido la identificación de un buen número de alteraciones celulares y moleculares que mimetizan fenómenos comparables a los ocurridos en el cerebro de individuos afectados por la EA (Mórocz *et al.*, 2002; Bartolomé *et al.*, 2007; Ciccocioppo *et al.*, 2008). En el caso de las CMSP, los linfocitos representan el mejor modelo de estudio, pues muestran muchas similitudes fisiológicas y bioquímicas con las neuronas, como encontrarse en el mismo estado de ciclo celular y presentar sistemas biológicos idénticos o similares, como el sistema metabólico de síntesis de APP (Li *et al.*, 1999), o la expresión de presenilinas (Takahashi *et al.*, 2003). Asimismo, estos modelos se pueden utilizar también para la búsqueda de biomarcadores que pudieran servir para el diagnóstico precoz de la EA, así como para la monitorización de posibles tratamientos terapéuticos. A continuación se detallan los aspectos de la EA en los que se ha centrado la realización de la presente Tesis Doctoral.

## 4.2. ESTRÉS OXIDATIVO EN EA

El estrés oxidativo está estrechamente ligado con la patogénesis de la EA (Figura 11), habiendo sido propuesto incluso como una causa temprana de la enfermedad (Aluise *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2010). Está descrito que el cerebro de los pacientes con EA tiene más estrés oxidativo que un cerebro de una persona sin EA, y además tiene una mayor susceptibilidad frente al mismo y menores niveles de antioxidantes naturales, como el  $\alpha$ -tocoferol (Axelsen *et al.*, 2011).



**Figura 11. Modelo esquemático de la influencia del estrés oxidativo en la patogénesis de la EA.** Los oligómeros de A $\beta$  generados en las neuronas activarían los canales de calcio de la membrana celular, produciéndose un aumento de su concentración intracelular. La elevada concentración de calcio favorecería la producción de RL y ROS a través de la mitocondria. Además, la presencia de metales incrementaría su producción vía reacción de Fenton y Haber-Weiss. Los RL y ROS producidos pueden atacar los lípidos de la membrana celular, las proteínas y los ácidos nucleicos. Figura compuesta a partir de Mondragón-Rodríguez *et al.* (2010) y Texel y Mattson (2011). **M.C.:** membrana celular; **APP:** proteína precursora amiloide; **β:** lugar de corte de β-secretasas; **γ:** lugar de corte de γ-secretasas; **Aβ-o:** oligómeros de péptidoβ -amiloide; **Ca<sup>2+</sup>:** calcio; **O<sub>2</sub><sup>·-</sup>:** anión superóxido; **SOD1:** superóxido dismutasa; **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrógeno; **HO<sup>·</sup>:** radical hidroxilo.

Es importante destacar que el sistema nervioso central es particularmente vulnerable a los efectos producidos por los RL debido a varias circunstancias:

- Tiene un elevado consumo de oxígeno (1/5 parte del consumo total del cuerpo) (Reiter, 1995).
- Su contenido de ácidos grasos poliinsaturados es abundante (Brenna y Diau, 2007).

- La cantidad de enzimas antioxidantes que posee es relativamente precaria (Halliwell, 1989).
- En el cerebro de pacientes con demencia tipo Alzheimer se han hallado niveles aumentados de algunos elementos, como hierro, cobre, zinc, mercurio y aluminio, que son potentes catalizadores para la producción de RL y ROS (Mutter *et al.*, 2010; Rusina *et al.*, 2011; Pithadia y Lim, 2012).

Además, el aumento en el estrés oxidativo de las personas con EA no se limita al tejido neural. También existe un elevado estrés oxidativo en tejidos periféricos (Gibson y Huang, 2002), que se ha observado en fibroblastos (Begni *et al.*, 2004; Naderi *et al.*, 2006; Ramamoorthy *et al.*, 2012), en células sanguíneas (Mórocz *et al.*, 2002; Kadioglu *et al.*, 2004; Leutner *et al.*, 2005; Sultana *et al.*, 2011) o incluso en fluidos corporales, como suero, plasma y orina (Kim *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2007; Casado *et al.*, 2008; Padurariu *et al.*, 2010). De este modo, se hace más sencillo poder realizar investigaciones relacionadas con el estrés oxidativo en EA, dado que el manejo de estos tejidos es mucho más fácil y menos costoso que el uso de tejido neural, ya sea en modelos animales o en cerebros *post mortem*. Por ello, se decidió utilizar CMSP y plasma sanguíneo como muestras de estudio en la presente Tesis Doctoral.

### **4.3. TERAPIAS ANTIOXIDANTES EN EA**

Debido a que el estrés oxidativo es un factor muy importante, tanto en la patogénesis como en el desarrollo de la EA, representa una atractiva diana para probar distintas aproximaciones terapéuticas que puedan prevenir la aparición de la enfermedad o retrasar sus consecuencias una vez diagnosticada. Existen multitud de compuestos que han sido utilizados con mayor o menor éxito. A continuación se describen brevemente, en función de su naturaleza:

#### **4.3.1. Fármacos**

Actualmente se han probado diversos fármacos para tratar la EA, como por ejemplo los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). Si bien no parece que la mayoría tengan algún tipo de efecto, existen estudios en los que inhibidores específicos de ciclooxigenasa-2 (COX-2), como el rofecoxib, redujeron el estrés oxidativo en modelos animales (Nivsarkar *et al.*, 2008), aunque parece que en humanos puede tener efectos secundarios negativos sobre el tracto intestinal, el hígado y los riñones (Wollen, 2010).

Actualmente el uso de este medicamento está prohibido, debido a que aumenta los riesgos de padecer problemas cardiovasculares (Jüni *et al.*, 2004). Aun así, se siguen investigando otros inhibidores de la COX-2 que pudieran remitir alguna de las características de la EA que estén relacionadas o no con estrés oxidativo (Small *et al.*, 2008).

Otra molécula que ha sido testada es el Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Se ha descrito que ha reducido el estrés oxidativo, además de otras consecuencias de la EA (daño sináptico o muerte celular, entre otras) en modelos animales de la enfermedad (Nagahara *et al.*, 2009). Sin embargo, es difícil que se pruebe este fármaco en humanos, dado que es una molécula demasiado grande para penetrar en la barrera hematoencefálica y su administración es demasiado arriesgada, pues debe hacerse directamente en el cerebro a través de una cánula que atraviese el cráneo (Slevin *et al.*, 2006).

#### **4.3.2. Extractos de plantas**

Existen diferentes moléculas derivadas de plantas que han sido estudiadas para determinar su posible utilización como terapia para la EA. La huperzina-A es una molécula alcaloide que se extrae del Licopodio aserrado (*Huperzia serrata*) y que se usa en la medicina tradicional china para tratar diversas enfermedades. Tanto en estudios *in vitro* como en modelos animales se ha observado que disminuye el estrés oxidativo, además de otras características de la EA (Wang y Tang, 2005) y aunque ya se han realizado algunos ensayos clínicos en humanos, es necesario profundizar en su estudio para determinar si puede existir algún efecto negativo (Wollen, 2010).

La curcumina es un polifenol que se extrae de la Cúrcuma (*Curcuma longa*) y es una prometedora molécula para la terapia de EA, pues además de su efecto antioxidante, tiene otras actividades neuroprotectoras, como la inhibición de la formación de A $\beta$ , la disolución de las placas ya existentes o efectos antiinflamatorios (Cole *et al.*, 2007). El problema de la curcumina es que, a pesar de penetrar fácilmente la barrera hematoencefálica, por vía oral se observa una baja absorción, por lo que debe combinarse con otras moléculas para mejorar su biodisponibilidad (Wollen, 2010). Sin embargo, en algunos ensayos clínicos en humanos no se observan efectos significativos tras su administración (Ringman *et al.*, 2008).

El resveratrol es otro polifenol que se encuentra en el vino tinto, cacahuetes y otras plantas, que reduce el estrés oxidativo además de otras características de la EA (Markus y Morris, 2008). Modelos animales de la enfermedad han demostrado que el



resveratrol reduce la neurotoxicidad y la muerte celular, y previene deficiencias en el aprendizaje (Kim *et al.*, 2007). Además, ya existe algún estudio en el que se detecta que un consumo moderado de vino tinto puede reducir el riesgo de padecer EA (Luchsinger *et al.*, 2004). Por el contrario, el resveratrol sufre el mismo problema de biodisponibilidad que la curcumina, necesitando ser administrado asociado a otros compuestos, como por ejemplo la quercetina. Además, el hecho de que el resveratrol se utilice como terapia en pacientes con EA está sujeto al éxito de ensayos clínicos en humanos, que actualmente se encuentran en fase II (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01504854>).

Además, también se han realizado estudios con extractos de Ginkgo (*Ginkgo biloba*) por poseer propiedades antioxidantes. Sin embargo los estudios en humanos han reportado resultados contradictorios en ensayos clínicos (Wollen, 2010), por lo que se hace necesario continuar profundizando en su estudio. Por otro lado, también se han probado las propiedades antioxidantes de los extractos de raíz de la Bufera o Gingseng Indio (*Withania somnifera*), obteniendo resultados positivos *in vitro* y en modelos animales (Kuboyama *et al.*, 2005; Tohda, 2008), si bien aún no se han realizado ensayos clínicos en humanos.

#### 4.3.3. Nutrientes y vitaminas

La suplementación con algunos nutrientes y vitaminas también ha sido estudiada como terapia para la EA, con diferentes resultados. Entre algunos de los nutrientes más utilizados se puede destacar:

- Ácido  $\alpha$ -lipoico: es un ácido graso que se encuentra en las células y algunos alimentos y puede ser sintetizado por el organismo. Es un potente antioxidante que puede atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica y ejercer efectos neuroprotectores (Maczurek *et al.*, 2008) y sus efectos antioxidantes han quedado demostrados en modelos de la enfermedad, tanto *in vitro* como *in vivo* (Farr *et al.*, 2003; Moreira *et al.*, 2007). Sin embargo, aún son necesarios más ensayos clínicos para obtener resultados fiables acerca de su utilidad como suplemento terapéutico (Wollen, 2010).
- Acetil-L-carnitina: derivado del aminoácido L-carnitina, es una molécula que inhibe la formación de RL y elimina los ácidos grasos tóxicos que pudieran dañar a la mitocondria (Carta *et al.*, 1993). Estudios *in vitro* han reportado una disminución en marcadores de daño oxidativo así como una menor muerte celular inducida por estrés oxidativo (Abdul *et al.*, 2006). Además, sus efectos

han sido testados con éxito en modelos animales de EA (Zhou *et al.*, 2011). También existen algunos ensayos clínicos en pacientes con EA que obtuvieron resultados prometedores (Pettegrew *et al.*, 1995; Montgomery *et al.*, 2003), si bien aún es necesario realizar estudios con un mayor número de participantes.

- Coenzima Q10: esencial para la producción de energía en la mitocondria, se ha observado que debido a sus propiedades antioxidantes reduce el estrés oxidativo en ensayos *in vitro* y en modelos murinos (Ono *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2008). Además, también ha generado resultados positivos de ensayos clínicos en enfermedades neurodegenerativas que no son EA (Liu *et al.*, 2011). Sin embargo, aún no hay publicado ningún ensayo clínico en pacientes con EA. No obstante, la variante sintética de la coenzima Q10, la idebenona, sí ha sido testada en pacientes con EA, aunque con resultados dispares (Wollen, 2010).

- N-acetil-cisteína (NAC): es una molécula precursora del GSH, el antioxidante con mayor prevalencia en el cerebro y el más importante en el ser humano. Atraviesa con facilidad la barrera hematoencefálica (Anderson y Luo, 1998), de manera que provee cisteína, el sustrato limitante en la síntesis de GSH (Kimura y Kimura, 2004; Pocernich y Butterfield, 2012). Además de incrementar los niveles de GSH, la NAC es capaz de interactuar directamente con los RL (Aruoma *et al.*, 1989; Pocernich y Butterfield, 2012). Estudios *in vitro* desarrollados en células asociadas a EA, tanto neurales como extraneurales, han mostrado una prevención en los efectos tóxicos de  $\text{A}\beta$  y una disminución en los niveles de biomarcadores de daño oxidativo, así como una reducción en la muerte celular (Moreira *et al.*, 2007; Hsiao *et al.*, 2008). Adicionalmente, los trabajos realizados en modelos *in vivo* también detectan un efecto beneficioso de la NAC sobre el daño oxidativo presente en estos modelos de EA (Farr *et al.*, 2003; Tchantchou *et al.*, 2005; Hazel *et al.*, 2006; Hsiao *et al.*, 2012). Por otro lado, existe algún ensayo clínico en humanos (Adair *et al.*, 2001), pero tiene ciertas limitaciones y las conclusiones han de corroborarse con trabajos más exhaustivos. Por estos motivos, la NAC fue seleccionada como uno de los antioxidantes de referencia para la realización de la presente Tesis Doctoral.

También es común el uso de tratamientos basados en la suplementación con vitaminas con propiedades antioxidantes. El ácido ascórbico (AA), o vitamina C, es una molécula que juega un papel muy importante en el desarrollo del cerebro y que además ofrece protección durante todo el ciclo de vida (Harrison y May, 2009). Es uno de los antioxidantes más efectivos en el plasma sanguíneo, debido a su solubilidad en

medio acuoso y al amplio rango de RL que es capaz de interceptar (Frei *et al.*, 1990). Otra de las ventajas del uso del AA es su bajo coste y su baja toxicidad (Harrison, 2012). Existen estudios *in vitro* que han demostrado que el AA disminuye los biomarcadores de estrés oxidativo y reduce la muerte celular en modelos celulares neurales y en células de neuroblastoma de modelos murinos de EA (Yallampalli *et al.*, 1998; Montilla-López *et al.*, 2002; Heo *et al.*, 2004). En modelos animales, se ha conseguido mejorar algunas funciones cognitivas en ratones doble-mutantes para los genes de la APP y de la proteína presenilina-1 (Harrison *et al.*, 2009), y aunque no detectaron cambios en el estatus oxidativo del cerebro a corto plazo, postulan que esas mejoras cognitivas se deberían en gran medida a los efectos antioxidantes que sí serían detectables a largo plazo. Atendiendo a los estudios existentes en humanos basados en suplementación, se han observado resultados dispares (Arlt *et al.*, 2012; Kontush, *et al.*, 2001; Fillenbaum *et al.*, 2005), si bien en algunos de ellos se podría mejorar el diseño experimental teniendo en cuenta el papel de los transportadores celulares del AA (Harrison, 2012).

Otra vitamina que ha sido investigada para su uso en terapias antioxidantes frente a EA es el  $\alpha$ -tocoferol o vitamina E (incluyendo sus equivalentes, como el Trolox). Se han observado resultados beneficiosos *in vitro*, tanto en células neurales (Behl *et al.*, 1992; Pereira *et al.*, 1999; Kölsch *et al.*, 2001; Butterfield, 2002; Behl y Moosmann, 2002) como en tejidos extraneurales (Kontush y Schekatolina, 2004), donde disminuye el daño oxidativo y la muerte celular. Además, reduce los marcadores de estrés oxidativo y previene la pérdida de funciones cognitivas en modelos animales de la enfermedad (Yamada *et al.*, 1999; Sung *et al.*, 2004). No obstante, los resultados de ensayos realizados en humanos son más bien contradictorios. Algunos estudios detectan acciones beneficiosas (Sano *et al.*, 1997; McIntosh *et al.*, 1999; Pavlik *et al.*, 2009), mientras que otros, en cambio, no observan ningún efecto o incluso reacciones negativas (Boothby y Doering, 2005; Petersen *et al.*, 2005; Arlt *et al.*, 2012). Recientemente, se ha propuesto la Hipótesis de la Paradoja de la Vitamina E en EA (Lloret *et al.*, 2009). Siguiendo las indicaciones de esta hipótesis, otros estudios ya han observado que antes de realizar cualquier tratamiento con este suplemento ha de testarse en el paciente, pues puede que su uso resulte o no beneficioso (Brewer, 2010; Viña *et al.*, 2011).

Por último, otra estrategia complementaria a la hora de probar terapias antioxidantes en EA es la de combinar suplementos. Se han obtenido resultados positivos combinando diferentes agentes tanto en modelos animales (Harkany *et al.*,

1999; Harrison *et al.*, 2009; Suchy *et al.*, 2009), como en ensayos con humanos (Kontush *et al.*, 2001; Fillenbaum *et al.*, 2005; Lott *et al.*, 2011; Galasko *et al.*, 2012), donde casi siempre estaba presente la combinación de las vitaminas C y E. Por ello, debido a la gran cantidad de estudios existentes relacionados con estas dos vitaminas, también han sido incluidas como antioxidantes de referencia para ser utilizadas en esta Tesis Doctoral.

## **5. AGUAS MINERO-MEDICINALES SULFURADAS**

Las aguas minero-medicinales han sido utilizadas como medida terapéutica en los seres humanos desde la antigüedad, como se ha podido comprobar en diferentes yacimientos de la Península Ibérica (Moltó, 1992).

Legalmente, el concepto de agua minero-medicinal se define como “aquellas aguas de origen natural utilizadas en terapéutica y con propiedades terapéuticas conocidas y probadas” pero que además cumplen con una serie de requisitos (Armijo, 1968):

- Los límites de su composición no deben disminuir de unos mínimos y siempre deben mantener una constante. La constancia de su composición va unida a su acción terapéutica, y por supuesto, ha de estar totalmente exenta de sustancias que impliquen riesgo para la salud.
- Contener más de un gramo por litro de sustancias minerales disueltas, si bien para su clasificación es preciso que la relación de un determinado componente con los de la totalidad de su misma carga sea por lo menos de 20 miliequivalentes por cien.
- Contener por litro, prescindiendo de su mineralización total, sustancias o elementos particularmente activos.

La Sociedad Española de Hidrología Médica propone diversas clasificaciones de las aguas minero-medicinales, siendo la más utilizada la clasificación química por el contenido aniónico/catónico predominante, donde un anión/catión debe aparecer más del 20% de la mineralización global para clasificar el agua como tal. Cabe destacar que un agua minero-medicinal puede compartir características de la siguiente clasificación y suelen encontrarse, además, oligoelementos que también son responsables de otras acciones. Los principales grupos de aguas minero-medicinales

son: cloruradas, sulfatadas, sulfuradas, biocarbonatadas, carbogaseosas, radiactivas, oligometálicas y ferruginosas. Además, otra clasificación de las aguas minero-medicinales puede hacerse en función de su temperatura, clasificándose del siguiente modo: aguas frías (menos de 20 °C), aguas hipotermas o templadas (de 21 a 35 °C), aguas mesotermas o calientes (de 35 a 45 °C) y aguas hipertermas o muy calientes (más de 45 °C).

De todos los yacimientos encontrados en la Península Ibérica, más de la mitad contienen aguas minero-medicinales sulfuradas, siendo activos en la actualidad el 25% de los balnearios que ofrecen este tipo de aguas (Moltó, 1992).

Una de las características más importantes del agua sulfurada (AS) es su alto contenido en sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S). Esta molécula ha generado en los últimos años un gran interés en la comunidad científica, pues se han descubierto multitud de funciones en el organismo relacionadas con ella. Se ha descrito que está presente en el plasma sanguíneo a una concentración de entre 25 y 80 µM y su vida media es de, al menos, 30 minutos (Wang *et al.*, 2010). Puede participar en la angiogénesis, la modulación de la tensión sanguínea, tener efectos vasculoprotectores, hepatoprotectores y nefroprotectores, proteger la mucosa gástrica, regular la inflamación y muerte celular o actuar como neuromodulador (Kimura, 2002; Qu *et al.*, 2008; Whitmore y Moore, 2009; Wang *et al.*, 2010; Predmore *et al.*, 2012). Además, se ha detectado en estudios *in vitro* que los astrocitos humanos producen H<sub>2</sub>S en respuesta a estímulos pro-inflamatorios y frente a daño neuronal, lo que le confiere un carácter neuroprotector (Lee *et al.*, 2009). De este modo, se podría esperar que el AS tuviera efectos similares.

En relación con la EA, se ha observado que los cerebros de personas con la enfermedad tienen el H<sub>2</sub>S significativamente disminuido respecto de personas sanas (Eto *et al.*, 2002; Kamoun, 2004). Debido a ello y a las propiedades mencionadas del H<sub>2</sub>S, se está investigando la posible incorporación de esta molécula como aproximación terapéutica en EA. Actualmente, existen estudios *in vitro* que observan efectos del H<sub>2</sub>S que podrían ser beneficiosos en el desarrollo de la enfermedad (Lee *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011), y ya se han probado diferentes compuestos que contienen H<sub>2</sub>S en estudios con animales con resultados prometedores (Chauhan, 2006; Gong, 2010).

Ahora bien, todas las propiedades anteriormente mencionadas tienen un denominador común: la protección frente a estrés oxidativo. Por ello, se puede afirmar

que la actividad más importante del H<sub>2</sub>S es su capacidad antioxidante. El H<sub>2</sub>S reacciona fácilmente con, al menos, cuatro ROS diferentes: O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroxinitrito e hipoclorito (Braga *et al.*, 2012) y también puede eliminar el exceso de óxido nítrico producido durante los procesos de inflamación (Kimura y Kimura, 2004). Además, también demuestra sus propiedades antioxidantes aumentando la síntesis de GSH (Kimura y Kimura, 2004; Braga *et al.*, 2008 y 2012; Benedetti *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2009; Predmore *et al.*, 2012).

Hoy en día, la mayoría de los tratamientos realizados con AS se han aplicado de manera tópica, ya que su absorción es mucho mayor que por vía digestiva (Ekmekcioglu *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2009). Sin embargo, también se han realizado curas hidropínicas con buenos resultados (Benedetti *et al.*, 2009), a pesar de su sabor metálico y su mal olor, que podrían resultar un inconveniente en relación a la aceptación del tratamiento por parte de los posibles pacientes. No obstante, aún no existen estudios que relacionen directamente los efectos antioxidantes del AS en biomarcadores de daño oxidativo en pacientes de EA, por lo que resulta de gran interés investigar sobre ello, en busca de una futura aplicación terapéutica que pueda complementar a las ya existentes.



## **II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**





El objetivo general de esta Tesis Doctoral fue aportar nuevos datos sobre cómo el progresivo envejecimiento que se observa en la población mundial está afectando a personas con trastornos de elevada incidencia, como son el SD y la EA, que cursan con patologías del sistema nervioso (deficiencia mental y demencia, respectivamente). Además, dado que en un elevado porcentaje las personas con SD acaban desarrollando EA se eligieron estas dos poblaciones para la realización la presente Tesis Doctoral.

En el caso del SD, aunque se ha observado que la función renal sufre cierto deterioro a medida que la edad avanza y que la excreción urinaria de Cr está disminuida en la población mayor, no existe bibliografía concluyente acerca de si esta función está afectada en este síndrome, pues hasta hace poco la esperanza de vida de estas personas no era muy elevada. Está descrito que las personas con SD sufren un envejecimiento prematuro que puede estar causado en gran parte a un elevado estrés oxidativo debido a un efecto de dosis de la enzima SOD1 (codificada en el cromosoma 21). En trabajos previos de nuestro laboratorio, donde se analizan biomarcadores de estrés oxidativo urinarios ya se sugiere que pueden existir problemas en la función renal de estas personas. Sin embargo, aún no existía ningún estudio concreto que analizara esta función. Además, dado que una de las patologías más frecuentes en personas con SD es el hipotiroidismo, también se trató de relacionar la función renal con una disminución en la producción de hormonas tiroideas.

Por otro lado, el progresivo envejecimiento poblacional tiene como consecuencia que enfermedades en las que el envejecimiento es uno de los factores de riesgo, como la EA, hayan aumentado su incidencia en las poblaciones humanas. Por ello, la búsqueda de nuevas aproximaciones que permitan mejorar la calidad de vida en este tipo de personas adquiere una gran importancia. Está descrito que el estrés oxidativo juega un papel muy importante en la patogénesis de la EA, y que las personas con EA muestran niveles elevados de estrés oxidativo, tanto en tejidos neurales como extraneurales. De este modo, es posible usar células sanguíneas de personas con EA para investigar diferentes aspectos de la enfermedad, ocasionando el menor trastorno posible al paciente y obteniendo gran cantidad de material para trabajar con él. Por otro lado, el daño oxidativo está siendo considerado como posible diana terapéutica para mejorar la homeostasis de personas con esta enfermedad neurodegenerativa y, aunque se han probado diferentes agentes antioxidantes como aproximación terapéutica, aún no se conoce ningún estudio que utilice aguas minero-medicinales sulfuradas. La característica principal de estas aguas es que poseen una

gran capacidad antioxidante y neuroprotectora, gracias al sulfuro de hidrógeno que contienen.

Por todo ello, se seleccionaron los siguientes objetivos concretos:

1. Determinar los niveles urinarios de Cr y GE en una población con SD de la Comunidad de Madrid y compararlos con los de una población control de la misma área geográfica.
2. Relacionar los niveles urinarios de Cr y GE con parámetros socio-demográficos: sexo, edad y hábitos alimenticios en ambas poblaciones (SD y controles).
3. Establecer una conexión entre hipotiroidismo y función renal en SD, de manera que se pueda determinar si el hipotiroidismo podría afectar a la función renal de personas con SD.
4. Determinar los niveles de estrés oxidativo en una población con EA de la Comunidad de Madrid, a través de biomarcadores de daño oxidativo a ADN, proteínas y glicoxidación, así como niveles de antioxidantes, comparándolos con una población control sin EA de la misma área geográfica.
5. Analizar *in vitro* las ventajas del uso de antioxidantes como terapia en la EA utilizando las propiedades antioxidantes del AS, respecto del daño oxidativo al ADN en EA, comparándolas con las propiedades de otros antioxidantes exógenos ya conocidos.
6. Relacionar el daño oxidativo al ADN con la viabilidad celular en CMSP de personas con EA.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. MUESTRA POBLACIONAL

### 1.1. MUESTRA POBLACIONAL SD

El grupo con SD estaba compuesto por 103 individuos, 49 varones y 54 mujeres, con edades comprendidas entre 1 y 57 años (media=24 años). En todos ellos fue comprobado el diagnóstico mediante análisis citogénético que fue facilitado por sus progenitores o tutores legales al laboratorio. De los 103 individuos con SD, 96 individuos presentaban trisomía regular del cromosoma 21, 5 individuos trisomía del cromosoma 21 por translocación robertsoniana y 2 individuos mosaicismo. Los integrantes de este grupo pertenecían a diferentes colegios y centros de educación especial (en el caso de los más jóvenes) o a centros de día para personas con discapacidad intelectual (en el caso de los adultos) y todos residían en la Comunidad de Madrid.

La población control de SD estaba compuesta por 82 individuos (33 varones y 49 mujeres), no fumadores, aparentemente sanos y con un complemento cromosómico diploide normal (sin SD). Las edades de los individuos pertenecientes a este grupo estaban comprendidas en el rango de 5 a 59 años (media=27 años). Otra característica importante de este grupo es que, además, estaba formado en su totalidad por hermanos y hermanas de los integrantes del grupo con SD. De esta manera se pretendió limitar, en la medida de lo posible, la influencia de los factores ambientales, fundamentalmente la alimentación.

Con objeto de estudiar con más profundidad el efecto del factor 'Edad' en las variables seleccionadas, las dos poblaciones fueron subdivididas en 5 grupos diferentes de edad: Grupo I (1-9 años, 23 individuos), Grupo II (10-15 años, 28 individuos), Grupo III (16-25 años, 59 individuos), Grupo IV (26-40 años, 40 individuos) y Grupo V (mayores de 40 años, 35 individuos). Estos grupos representan, respectivamente: infancia, adolescencia pre-menarquia (basado en mujeres), edad adulta temprana, edad adulta y senescencia (basado en los individuos con SD y de acuerdo a la clasificación de Bittles *et al.*, 2007).

A todos los individuos o sus representantes legales se les entregó un cuestionario donde se solicitaba información acerca de parámetros sociodemográficos (sexo y edad), cariotipo, estilo de vida (hábitos alimenticios relacionados con la frecuencia de ingesta de diferentes tipos de alimentos) y si estaban siguiendo algún tipo de tratamiento para el hipotiroidismo (sobre todo para el caso de la población con SD).

## **1.2. MUESTRA POBLACIONAL EA**

El grupo con EA lo compusieron 25 individuos, 17 mujeres y 8 varones, con edades comprendidas entre los 66 y los 93 años (media=79 años). El diagnóstico se realizó en la Unidad de Demencias del Servicio de Geriatria del Hospital Clínico San Carlos de Madrid siguiendo los protocolos estándar de diagnóstico de esta patología (McKhann *et al.*, 1984; Roth *et al.*, 1986).

Con objeto de tener unos datos de referencia con los que poder contrastar los resultados obtenidos en el grupo con EA, se utilizó una muestra poblacional de personas clínicamente sanas para esta patología y con un rango de edad similar. Este grupo control estaba compuesto por 25 individuos, 7 mujeres y 18 varones, con un rango de edad comprendido entre los 58 y los 88 años (media=76 años). Las muestras de los individuos pertenecientes a este grupo fueron obtenidas del Sanatorio San Francisco de Asís de Madrid.

## **2. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

La obtención de las muestras se realizó de acuerdo con los estándares éticos trazados por la Asociación Médica Mundial en la declaración de Helsinki de 1975 y en sus posteriores revisiones (Asociación Médica Mundial, 2008). La realización del trabajo fue aprobada por el Comité de Bioética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

En el caso de la población con SD, se seleccionó la orina como matriz donde se analizarían las variables de estudio: Cr y GE. La elección de orina como matriz de estudio fue debida a que su obtención es menos traumática, tiene menos riesgos de contagio de enfermedades para participantes e investigadores y proporciona un volumen suficiente para realizar múltiples ensayos. Todos los participantes de este estudio o sus representantes legales firmaron el consentimiento informado para ser incluidos en el estudio, donde se les detallaba los análisis que se iban a realizar y daban su conformidad para tratar los datos.

De este modo, las muestras de orina de primera hora del día fueron recogidas en los lugares donde se realizaba la actividad diaria de los participantes con SD (guarderías, colegios de educación especial y centros de día), así como las de la población control, puesto que ésta estaba formada por hermanos de los individuos con SD. La muestra fue recogida en un bote estéril tapado con papel de aluminio para

evitar su exposición a la luz directa. La Cr se determinó en las dos horas siguientes a la recogida de la muestra, y la orina restante se alicuotó en viales de 1 mL que se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para la posterior determinación de la GE.

Por otro lado, dado que la EA debe ser diagnosticada por un clínico, la colaboración con los hospitales citados permitió el uso de muestras de sangre, en las que se puede evaluar un mayor número de biomarcadores de estrés oxidativo que en la orina. Las muestras de sangre periférica fueron extraídas en ambos hospitales a primera hora de la mañana en tubos conteniendo ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA) como anticoagulante. Todos los individuos integrantes del estudio, o sus representantes legales, dieron su conformidad para ser incluidos en el estudio (consentimiento informado) y pertenecían a la misma área geográfica (Comunidad de Madrid).

Para realizar el análisis de los biomarcadores de estrés oxidativo elegidos fue necesario separar el plasma sanguíneo de las CMSP. Para ello, se realizó un gradiente de Ficoll-sacarosa generado con el reactivo Histopaque-1077<sup>TM</sup> (Sigma-Aldrich), según el protocolo de la casa comercial. Esta separación está basada en un gradiente de densidad, que permite que las células mononucleares se separen del resto de componentes sanguíneos con una densidad mayor de  $1,077\text{ g/mL}$ . El plasma se dispuso en la fase superior y los eritrocitos y granulocitos sedimentaron al fondo, quedando separados de las CMSP por el Histopaque-1077<sup>TM</sup> (Figura 12).

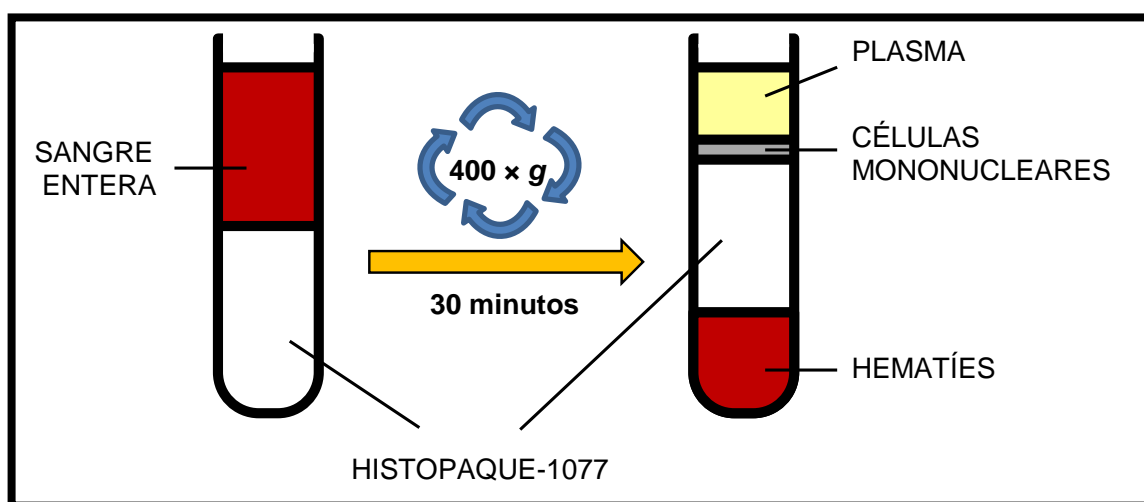


Figura 12. Esquema ilustrativo de la separación de células mononucleares y plasma sanguíneos.

Para obtener un mayor rendimiento en el número final de células aisladas, se diluyó la sangre en tampón fosfato salino (PBS; fosfato sódico 10 mM, pH 7,4,



conteniendo NaCl 140 mM) en una relación 1:2. Se usó PBS al ser una solución isotónica que mantiene la integridad celular.

Una vez separados los componentes sanguíneos, las células se resuspendieron en 1 mL de medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640, Gibco) para la determinación del daño oxidativo en el ADN. Se utilizó la variante del medio RPMI-1640 sin rojo fenol (ya que este compuesto puede interferir en las reacciones redox de la célula). Antes del análisis de daño oxidativo al ADN se realizó el recuento y se determinó la viabilidad de las células extraídas de la muestra sanguínea. El recuento y viabilidad celular se realizaron al mismo tiempo, en un microscopio óptico de campo claro (Nikon) usando una cámara de Neubauer doble Bright Line (Western Germany) con 0,1 mm de profundidad y 0,0025 mm<sup>2</sup> como área del cuadrado más pequeño. La viabilidad celular se estimó mediante la técnica de exclusión del azul de tripano (Sigma-Aldrich). Esta técnica consiste en añadir un 10% de azul de tripano al volumen final de solución celular que se quiera analizar, de manera que las células no viables dejan pasar el colorante a su interior, debido a la degradación de la membrana celular, viéndose de color azul al microscopio. El porcentaje de viabilidad se calculó dividiendo el número de células viables (no teñidas de azul) entre el número total de células y multiplicando el resultado por 100. Toda muestra con una viabilidad inferior al 90% fue excluida del estudio.

Por otro lado, el plasma recogido (aproximadamente 3-4 mL) se almacenó en alícuotas a -80 °C para los posteriores análisis de daño oxidativo a proteínas, daño por glicoxidación y las determinaciones de estatus antioxidante.

### **3. TRATAMIENTOS ANTIOXIDANTES Y OXIDANTES EN EA**

En paralelo a la determinación del daño oxidativo al ADN en CMSP de personas con EA se realizaron los tratamientos antioxidantes y oxidantes para evaluar los efectos antioxidantes del AS, tanto en el daño oxidativo al ADN como en la viabilidad celular de CMSP.

#### **3.1. SELECCIÓN DE AGENTES ANTIOXIDANTES**

En esta Tesis Doctoral se evaluó por primera vez el efecto antioxidante del AS en células de pacientes con EA. Se utilizó un AS proveniente del manantial Platea, situado en Calatayud, y cuyas características físico-químicas se describen en detalle en la Tabla 4.

Para comparar los efectos del AS sobre las CMSP sometidas a estrés oxidativo inducido, se utilizaron diferentes agentes antioxidantes cuyos efectos ya habían sido previamente descritos (Duthie *et al.*, 1996; Noroozi *et al.*, 1998; De la Fuente y Victor, 2001; Zachwieja *et al.*, 2005; Arranz *et al.*, 2007; Sudheer *et al.*, 2007). Se utilizaron ácido ascórbico (AA, Fluka), el análogo soluble del  $\alpha$ -tocoferol (Trolox, Sigma-Aldrich) y N-acetil-cisteína (NAC, Sigma-Aldrich), tanto para el análisis del daño al ADN como para el estudio de viabilidad celular por MTT.

**Tabla 4. Características químicas y físicas del agua mineral natural de Platea (Calatayud).** Hernández Torres *et al.* (2007). Reproducción autorizada por SUCARSE, S.L.

<b>pH</b>	6,7	<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	<0,02 mg/L
<b>CO<sub>2</sub></b>	21,0 mg/L	<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	<5 mg/L
<b>H<sub>2</sub>S</b>	8,83mg/L	<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	3910 mg/L
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	650,5 mg/L	<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	0,1 mg/L
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	466,5 mg/L	<b>S<sup>2-</sup></b>	8,31 mg/L
<b>Na<sup>+</sup></b>	2460 mg/L	<b>Hierro</b>	0,72 mg/L
<b>K<sup>+</sup></b>	15,5 mg/L	<b>SiO<sub>2</sub></b>	39,9 mg/L
<b>HCO<sub>3</sub><sup>+</sup></b>	276 mg/L	<b>Sr<sup>2+</sup></b>	11,28 mg/L
<b>F<sup>-</sup></b>	3,1 mg/L	<b>Li<sup>+</sup></b>	0,48 mg/L
<b>Cl<sup>-</sup></b>	3290 mg/L	<b>Mn<sup>2+</sup></b>	0,09 mg/L

### 3.2. SELECCIÓN DE AGENTES OXIDANTES

Para inducir daño oxidativo a las CMSP se eligieron dos agentes oxidantes: peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Foret) y homocisteína (HCY, Sigma-Aldrich). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se seleccionó debido a su larga vida media y su estabilidad en el medio fisiológico y se utilizó para el análisis del daño en el ADN así como para los estudios de viabilidad celular mediante MTT. La HCY es un aminoácido no proteico que puede inducir daño oxidativo de manera indirecta, mediante la generación de especies reactivas que pueden producir daño oxidativo a diferentes biomoléculas. Este aminoácido fue elegido como agente inductor de daño complementario solamente para los estudios de viabilidad celular mediante MTT.

### 3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL DE LOS TRATAMIENTOS CELULARES

Para la determinación de los posibles efectos antioxidantes del AS en pacientes con EA se diseñaron tres tipos de tratamientos a los que serían sometidas las CMSP de los individuos integrantes del estudio.

Por un lado, se realizaron tratamientos cuyo objetivo fue comprobar que tanto el AS como los agentes antioxidantes de referencia no generaban un daño oxidativo *per se* (tratamientos A). Los resultados de estos tratamientos se compararon con los observados en las condiciones basales (CMSP sin añadirles ningún agente). La realización de este tratamiento evitó una posible infravaloración de los efectos protectores de los antioxidantes analizados en los resultados obtenidos con los tratamientos de tipo C (ver más adelante).

El siguiente tipo de tratamientos (tratamientos B) consistió en la generación de daño oxidativo adicional a las CMSP inducido por agentes oxidantes exógenos ( $H_2O_2$  y HCY). Los resultados de este tratamiento también se compararon con las condiciones basales, de manera que se pudiera observar si el aumento de estrés oxidativo inducido era significativo respecto a las condiciones iniciales.

Para finalizar, el tercer tipo de tratamientos (tratamientos C) consistió en la adición previa de agentes antioxidantes a la generación de daño oxidativo por agentes oxidantes. De esta manera, se analizó si los agentes antioxidantes seleccionados eran capaces de prevenir el daño generado por los agentes oxidantes, comparando los resultados con los de los tratamientos de tipo B.

Todos los tratamientos celulares se realizaron sobre una densidad celular de  $10^4$  células en un volumen final de 100  $\mu$ L. En la Figura 13 se describe el proceso de manera esquemática. Los tratamientos con antioxidantes se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Los tratamientos con  $H_2O_2$  y HCY se incubaron durante 30 minutos a 4 °C. Al finalizar cada tratamiento, se realizó una centrifugación a 100  $\times g$  durante 5 minutos y se resuspendieron las células en medio de cultivo RPMI-1640 sin rojo fenol para eliminar los agentes añadidos en cada tratamiento, y proceder al análisis de las muestras. En el caso de los tratamientos C, después del tratamiento con el antioxidante también se centrifugó a 100  $\times g$  durante 5 minutos y tras desechar el sobrenadante se resuspendieron las células en el medio adecuado para el tratamiento con el agente oxidante, y una vez finalizado se procedió al lavado final como en los demás.

Todas las soluciones, tanto antioxidantes como oxidantes, fueron conservadas a 4 °C y llevadas a temperatura ambiente antes de ser utilizadas, a excepción del agua AS, que para mantener sus propiedades físico-químicas y su capacidad antioxidante era almacenada a -80 °C. Las concentraciones finales de los agentes antioxidantes y oxidantes se describen en la Tabla 5.

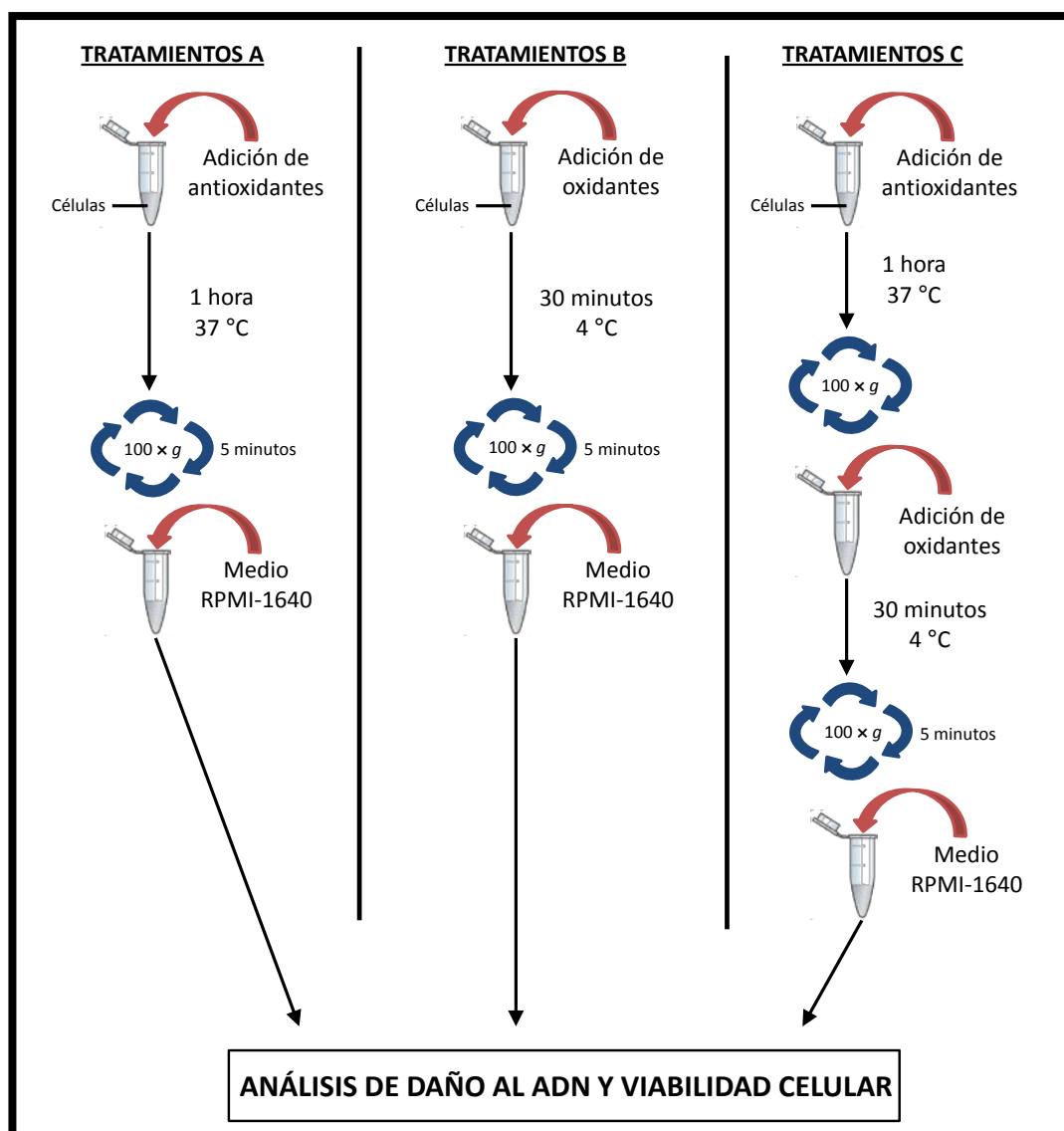


Figura 13. Ilustración esquemática de los tres tipos de tratamientos a los que fueron sometidas las células de los individuos con EA y la correspondiente población control.

Tabla 5. Concentraciones de los agentes antioxidantes y oxidantes utilizados. Para el AS se tiene en cuenta la concentración de sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ).

Antioxidantes	
Agua sulfurada ( $H_2S$ )	26 $\mu M$
Ácido ascórbico	10 $\mu M$
Trolox	60 $\mu M$
N-Acetil-Cisteína	2 mM
Oxidantes	
Peróxido de hidrógeno	100 $\mu M$
Homocisteína	10 mM

## **4. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS**

### **4.1. DETERMINACIÓN DE CREATININA**

La determinación de la concentración de Cr en las muestras de orina se realizó utilizando el método colorimétrico descrito por Varley y Gowenlock (1980). Este método, a su vez, está basado en la reacción de Jaffé (1986) donde, al añadir a la muestra una solución alcalina que contiene ácido pícrico, éste reacciona con la Cr resultando un compuesto de color anaranjado con un pico de absorbancia máxima a 500 nm. Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro UV (Shimadzu). Para calcular la concentración final de Cr en las muestras se realizó una curva de calibrado con concentraciones conocidas de Cr (Fluka), desde 40 mmol/L hasta 2,5 mmol/L (factor de dilución=2), de manera que la absorbancia de las muestras de orina se pudiera interpolar en ella. Los resultados se expresaron en mmol/L.

### **4.2. DETERMINACIÓN DE GRAVEDAD ESPECÍFICA**

Tras descongelar las muestras de orina y mantenerlas a temperatura ambiente, se procedió a determinar la GE mediante refractometría. Esta técnica se basa en el cálculo del índice de refracción (reducción de la velocidad de la luz al propagarse por un medio homogéneo). Para calcularlo se utilizó un refractómetro de mano RL2 (Rango de unidades de refracción=1,333-1,349. Polskie Zakłady Optyczne). Para convertir las unidades de índices de refracción a unidades de GE se utilizó una tabla de conversión comercial (Reichert) y los resultados se expresaron en unidades arbitrarias (U.A.).

### **4.3. DETERMINACIÓN DE DAÑO OXIDATIVO AL ADN**

Para valorar los niveles de daño oxidativo al ADN se utilizó la técnica del cometa o SCGE (Singh *et al.*, 1988) en su versión alcalina, según el protocolo estandarizado por Tice y Vasquez (1999). Brevemente, esta técnica consiste en la valoración de diferentes parámetros estandarizados que dan información del nivel de daño que existe en el ADN de las células analizadas. Estos parámetros son medidos mediante un software específico y se obtienen a partir de imágenes tomadas en un microscopio de fluorescencia en el que se observan niveles de migración de nucleoides de ADN de las células extraídas de la sangre, embebidos en agarosa, sobre portaobjetos esmerilados tras una electroforesis horizontal. La imagen de un nucleóide de ADN tras realizar el protocolo se asemeja a la de un cometa, de ahí el nombre popular que recibe la técnica. A continuación, se describen brevemente los

diferentes apartados que comprenden el protocolo de Tice y Vasquez (1999), esquematizados en la Figura 14:

A) Preparación de los portaobjetos con la primera capa de agarosa

Cada portaobjeto con borde esmerilado (Menzel-Gläser) se recubrió con una primera capa de agarosa mediante su inmersión en agarosa de punto de fusión normal (Bio-Rad) al 1% en PBS. Se sumergió también parte de la zona esmerilada para mejorar la sujeción de la agarosa al portaobjetos. A continuación, se eliminó la agarosa de una de las caras y se depositó encima de una superficie seca y horizontal (los portaobjetos se prepararon con al menos un día de antelación).

B) Inclusión de las células en la segunda capa de agarosa

Antes de la inclusión de las células, se preparó un volumen de agarosa de bajo punto de fusión (BPF, Bio-Rad) al 0,5% en PBS y se mantuvo a una temperatura constante de 37 °C en un baño termostático. A continuación se mezclaron 10 µL de suspensión celular de cada muestra con 75 µL de agarosa de BPF de manera que su número final de células siempre fuese del orden de  $10^4$ . La mezcla se transfirió a los portaobjetos con la primera capa de agarosa, distribuyéndola por la superficie del mismo. Para homogeneizar esta capa se colocó inmediatamente un cubreobjetos de 24x50 mm (Menzel-Gläser), teniendo cuidado de que no se formaran burbujas. Este procedimiento se realizó por duplicado para cada individuo de la población.

C) Gelificación de la segunda capa de agarosa

Para una correcta gelificación de la agarosa que contenía las células, los portaobjetos se mantuvieron a 4 °C durante 1 hora. Este período a 4 °C es una variación del protocolo original de Tice y Vasquez (1999), con el que se consiguió que el porcentaje de portaobjetos en los que se desprendía la segunda capa de agarosa fuese mucho menor que si se hubiesen dejado gelificar a temperatura ambiente.

D) Etapas de lisis

La finalidad de esta etapa es romper la membrana celular y nuclear para que se formen los nucleoides de ADN. La solución de lisis está compuesta por NaCl 2,5 M (Panreac), sal disódica EDTA 100 mM (Sigma-Aldrich), Tris 10 mM (Sigma-Aldrich), NaOH 250 mM (Panreac), Tritón X-100 al 1% (Sigma-Aldrich) y dimetilsulfóxido al 10% (DMSO, Sigma-Aldrich) en agua bidestilada y ajustada a pH 10. La función del DMSO en la solución de lisis es atrapar los RL generados por el hierro liberado de la hemoglobina residual. Estos RL generados por la reacción de Fenton podrían producir

un daño adicional en el ADN, ocasionando una sobrevaloración de los resultados finales.

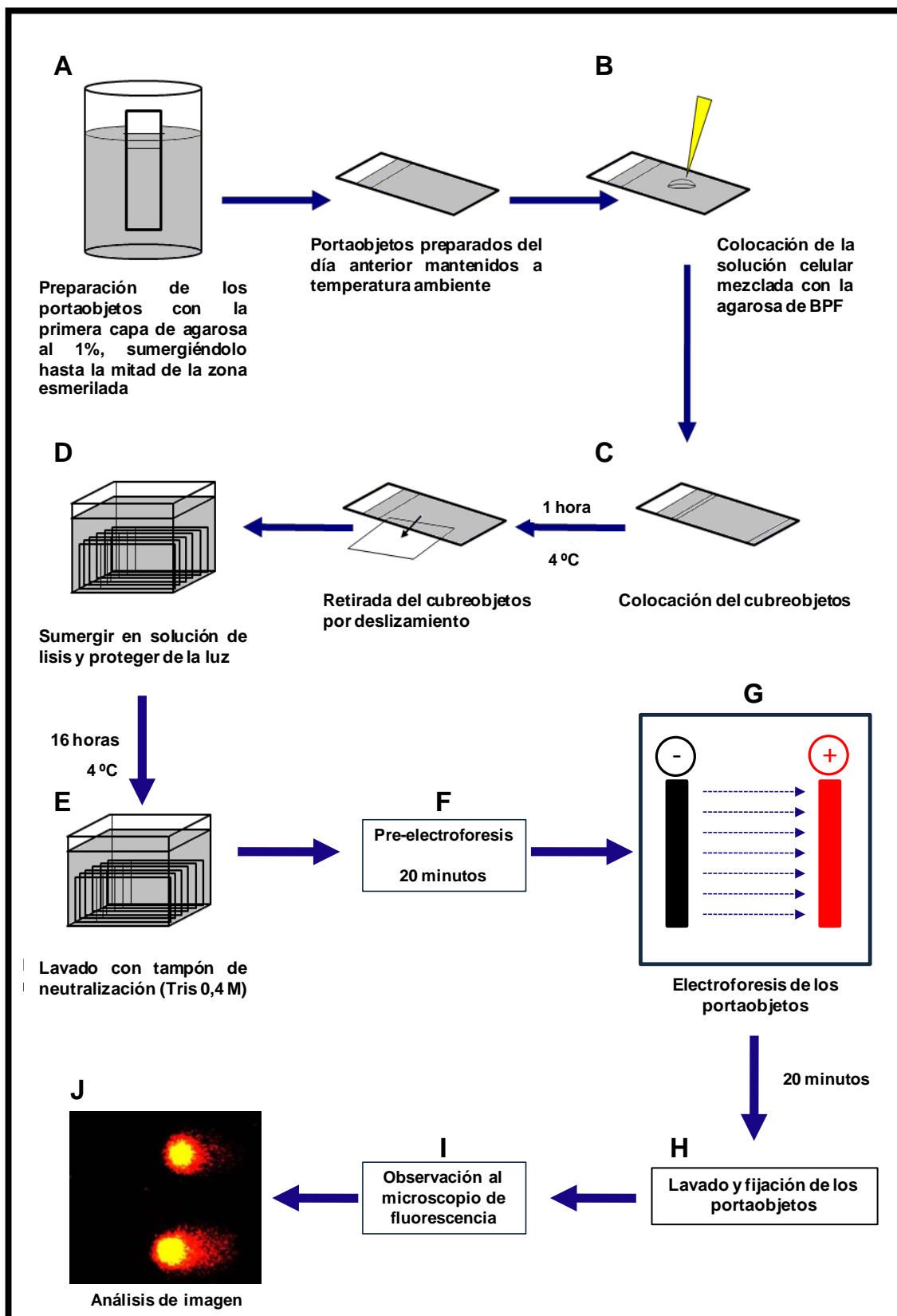


Figura 14. Esquema ilustrativo de los pasos realizados en la técnica del cometa o SCGE.

Una vez transcurrida la hora de gelificación a 4 °C, se retiraron los cubreobjetos por deslizamiento. Posteriormente, se sumergieron en una jarra de Coplin que contenía solución de lisis refrigerada a 4 °C y se mantuvieron a la misma temperatura durante toda la noche en oscuridad para evitar el posible daño generado por luz UV.

#### E) Etapa de neutralización

Para eliminar los restos de las sales de la solución de lisis, que podrían interferir en la migración posterior de los nucleoides de ADN en la etapa de electroforesis, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con una solución Tris 0,4 M a pH 7,5 en las mismas jarras de Coplin sometidas a agitación suave.

#### F) Etapa de pre-electroforesis

A continuación de los lavados, los portaobjetos se sumergieron durante 20 minutos en una cubeta opaca de electroforesis (Biogen) que contenía un tampón compuesto por NaOH 300 mM y sal disódica EDTA 1 mM a pH 13 y refrigerado a 4 °C. Los objetivos de esta etapa son dos: por un lado es fundamental para que las hebras de ADN de los nucleoides se desenrollen, facilitando así su migración en la etapa de electroforesis, y por otro lado, es necesaria para que los posibles restos de las sales depositados en la agarosa durante la etapa de lisis difundan hacia el tampón, pues competirían con el ADN como electrolitos, afectando a la migración del mismo.

#### G) Etapa de electroforesis

La electroforesis de las muestras se realizó durante 20 minutos a una intensidad de corriente constante de 300 mA y a un voltaje de 1 V/cm. En esta etapa las hebras de ADN de los nucleoides migran hacia el polo positivo (debido a la carga neta negativa del ADN) a través de la malla reticular de la agarosa BPF en la que están incluidos. De este modo, cuanto más daño tenga el ADN, más roturas habrá en las hebras y por tanto más fácil será su migración a través de la agarosa.

#### H) Lavado final y fijación

Una vez finalizada la electroforesis, se sacaron los portaobjetos en posición horizontal y se realizaron 3 lavados con 1 mL de Tris 0,4 M a pH 7,5. Después del lavado final, se procedió a fijar el contenido de los portaobjetos para conservar el estado de los nucleoides al finalizar la migración electroforética. Para ello, se añadió 1 mL de etanol absoluto a 4 °C a cada portaobjetos durante 5 minutos en posición horizontal, y se dejaron secar en posición vertical protegidos de la luz durante una 1



hora. Una vez secos, los portaobjetos se almacenaron en cajas opacas a temperatura ambiente hasta su visualización al microscopio.

#### I) Visualización de los cometas

Para poder visualizar los nucleoides de ADN (a partir de ahora referidos como cometas) en el microscopio de fluorescencia se añadió bromuro de etidio (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 2 µg/mL. Este agente intercalante se introduce entre las hebras del ADN y al ser expuesto a luz UV, emite una señal de color anaranjado, que se ve aumentada unas 20 veces cuando está unido al ADN. Para la visualización de los cometas se utilizó un microscopio de epifluorescencia (Zeiss) con una cámara Leica DC200 acoplada al mismo y conectada a un ordenador dotado del software de captura de imagen Leica IM50 Image Manager.

De cada portaobjetos se obtuvieron imágenes de al menos 25 cometas a un aumento de 400x, pudiendo existir más de un cometa en la misma imagen. Las imágenes se tomaron con los ajustes de exposición, brillo y contraste a unos niveles que reducían al máximo el ruido de fondo de la imagen.

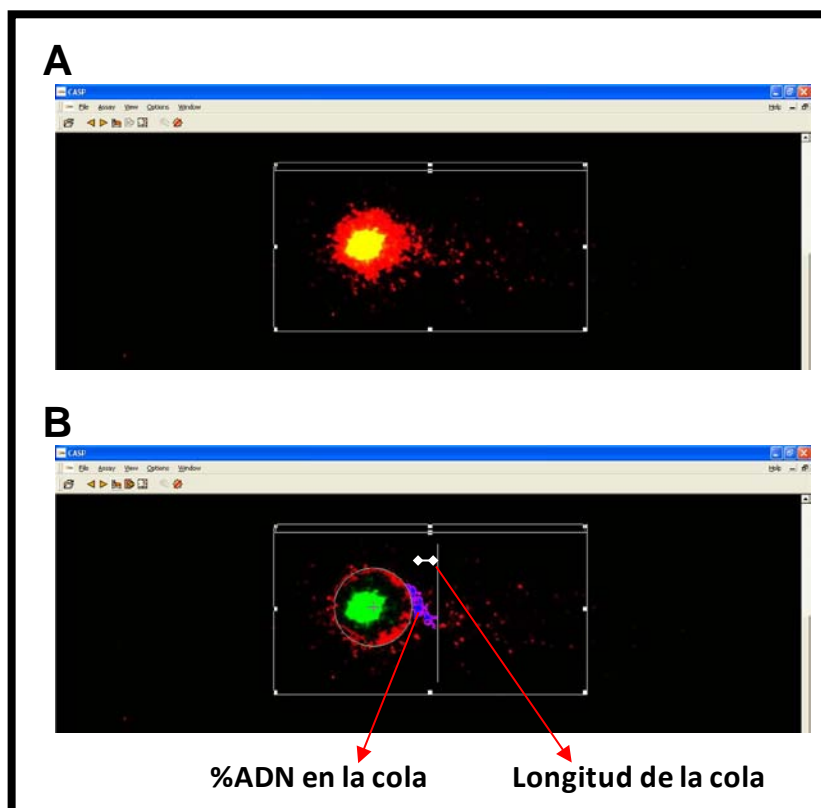
#### J) Caracterización y análisis de los cometas

Los cometas se analizaron usando un software de análisis de imagen específico de la técnica, denominado CASP (Comet Assay Software Project Lab). El método de cálculo de este programa se basa en las diferencias de intensidades existentes de los píxeles de la imagen a analizar. A pesar de que el programa analiza multitud de parámetros (como el área de la cabeza del cometa, el radio de la cabeza del cometa, etc) en este trabajo se analizaron los 3 que se consideraron más representativos para determinar daño en el ADN y que son los más usados por otros autores (Burlinson *et al.*, 2007): el tanto por ciento de ADN en la cola, la longitud de la cola (medida desde el borde del área de la cabeza del cometa hasta el final de la cola, en píxeles) y el momento de la cola (Figura 15), que resulta de la siguiente ecuación:

$$\text{Momento de la cola} = \text{longitud de la cola} \times (\% \text{ADN en la cola} / 100)$$

Para simplificar la nomenclatura, a partir de este punto nos referiremos a: ‘%ADN’, ‘Longitud’ y ‘Momento’. Se utilizaron los ajustes preestablecidos en el software, de manera que tanto para el cálculo del %ADN como para la Longitud, el software consideró aquellos píxeles que forman un área ininterrumpida a partir de la cabeza del cometa como pertenecientes a la cola del cometa. De este modo, el

software desechó píxeles sueltos que no pertenecían a la cola del cometa. De acuerdo con los creadores del software este es el ajuste óptimo para los mejores resultados.



**Figura 15. Ejemplo de análisis de un cometa mediante el software CASP. A.** Delimitación de la zona donde se encuentra el cometa a analizar, siendo el rectángulo más pequeño el que se toma como fondo para determinar los valores de referencia de intensidad de píxeles. **B.** Análisis del programa. La zona de color azul-morado representa los píxeles que han sido delimitados como cola del cometa, de los que se obtiene la variable ‘%ADN en la cola’. Por otro lado el segmento blanco representa la distancia que será determinada como la variable ‘Longitud de la cola’ del cometa.

#### 4.4. DETERMINACIÓN DE DAÑO OXIDATIVO A PROTEÍNAS

El daño oxidativo a proteínas se determinó en las muestras de plasma mediante la valoración de dos biomarcadores diferentes: el contenido de proteínas carboniladas y el contenido de di-tirosina. Previamente a las determinaciones, las muestras de plasma fueron descongeladas a temperatura ambiente. Para normalizar los valores de las variables en función del contenido de proteínas del plasma de cada individuo, se determinó la cantidad total de proteínas en el plasma mediante el método espectrofotométrico descrito por Bradford (1976), el cual consiste en la adición del

reactivo de Bradford (de color rojo) que en contacto con las proteínas de la muestra reacciona tornando a color azul, con un máximo de absorbancia a 590 nm. Para realizar la recta de calibrado se utilizaron concentraciones conocidas de la proteína inmunoglobulina G (Bio-Rad). Las determinaciones se realizaron por triplicado en un lector de microplacas (BIOTEK). La muestra de plasma fue diluida 1/50 en PBS y los resultados se expresaron en mg de proteína total.

La concentración de proteínas carboniladas presentes en las muestras de plasma se determinó siguiendo el método colorimétrico de Levine *et al.* (1990). Este método se basa en la transformación de la 2,4-Dinitrofenilhidrazina (DNPH o Reactivo de Brady) en 2,4-Difenilhidrazona tras reaccionar con los grupos carbonilos de las proteínas en medio ácido (con un pico de absorbancia máxima a 370 nm). Las determinaciones se realizaron por triplicado en un espectrofotómetro UV (Shimadzu) tras diluir las muestras 1/40 en PBS.

Para calcular la concentración final de proteínas carboniladas de la muestra se utilizó la ley de Lambert-Beer ( $\text{Absorbancia} = \epsilon \cdot d \cdot c$ ; siendo ' $\epsilon$ ' el coeficiente de extinción molar, ' $d$ ' la distancia recorrida por el haz de luz y ' $c$ ' la concentración de la muestra) usando cubetas con un paso de 1 cm y el coeficiente de extinción molar de la 2,4-Difenilhidrazona ( $\epsilon=22000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ). La concentración se referenció a la cantidad de proteínas de la muestra y se expresó como nmol carbonilos/mg proteína.

Por otro lado, la determinación del contenido de di-tirosina en las muestras de plasma se realizó siguiendo el método de Witko-Sarsat *et al.* (1996), con ligeras modificaciones. La técnica se basa en la medición de fluorescencia de la muestra (longitud de onda de excitación=315 nm; longitud de onda de emisión=410 nm) en presencia de urea. La medida se realizó por triplicado en un espectrofluorímetro Varioskan Flash 377 (Thermo Scientific) tras una dilución inicial 1/50 de las muestras en PBS. Los valores obtenidos se referenciaron a la cantidad de proteínas de la muestra y se expresaron como unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) de di-tirosina/mg proteína.

#### **4.5. DETERMINACIÓN DE DAÑO OXIDATIVO POR GLICOXIDACIÓN**

El análisis del daño oxidativo por glicoxidación se realizó mediante determinación del contenido de AGEs. Este biomarcador fue determinado por espectrofluorimetría, según el método de Yanagisawa *et al.* (1998) con ligeras modificaciones. La técnica se basa en la medición directa de fluorescencia de la muestra (longitud de onda de excitación=370 nm; longitud de onda de emisión=440

nm). La medición se realizó por triplicado en un espectrofluorímetro Varioskan Flash 377 (Thermo Scientific) tras una dilución inicial 1/50 de las muestras en PBS. Los resultados finales se expresaron en UAF.

#### 4.6. DETERMINACIÓN DE ESTATUS ANTIOXIDANTE

Para determinar el estatus antioxidante de las muestras de plasma de los individuos integrantes del estudio se utilizaron dos parámetros diferentes, la concentración de grupos tiol ( $-SH$ ) y la capacidad antioxidante del plasma mediante el método de la habilidad para reducir el ión férrico del plasma (FRAP).

La determinación de  $-SH$  se realizó siguiendo el método espectrofotométrico de Hu *et al.* (1994), modificado por Himmelfarb *et al.* (2000). El método se basa en la transformación realizada por los  $-SH$  de la muestra en medio básico del ácido ditionitrobenzoico (DTNB o reactivo de Ellman) en ácido tiobenzoico (TNB), cuyo pico de absorbancia máxima está a 412 nm. La medida se realizó por triplicado en un espectrofotómetro UV (Shimadzu).

Para calcular la concentración final de  $-SH$  se utilizó de nuevo la Ley de Lambert-Beer, usando cubetas de 1 cm de paso y el coeficiente de extinción molar del TNB ( $\epsilon=13600 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ). Los resultados obtenidos se expresaron en mmoles/L.

La capacidad antioxidante del plasma se determinó mediante el método FRAP, descrito por Benzie y Strain (1996). Este método se basa en la capacidad de los antioxidantes presentes en el plasma para reducir el complejo tripiridil-triazina férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) a su forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ). Este complejo tiene un color azul intenso y tiene un pico de absorbancia máxima a 593 nm. Como estándar para interpolar los resultados de absorbancia se utilizaron concentraciones conocidas de Trolox (Sigma-Aldrich) desde 2 mmoles/L hasta 0,063 mmoles/L (factor de dilución=2). La medida de las muestras se realizó por triplicado en un espectrofotómetro UV (Shimadzu) y los resultados fueron expresados en mmoles de equivalentes de Trolox/L.

#### 4.7. DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE MTT

La determinación de la viabilidad celular después de cada tratamiento se realizó mediante la técnica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), descrita por primera vez por Mossman (1983) y modificada por Denizot y Lang (1986). La técnica se basa en la reducción metabólica del MTT, realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células

tratadas. Así, la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. La determinación de la cantidad de formazán se realizó por triplicado mediante la medida de absorbancia a 540 nm en un lector de microplacas (Bio-Tek). Los resultados se muestran en porcentaje de viabilidad. Para referenciar los valores de absorbancia a porcentajes de viabilidad se hizo para cada muestra un control en el que se midió la absorbancia de células sin tratar. El porcentaje de viabilidad se obtuvo de la siguiente manera:

$$\% \text{ Viabilidad} = (\text{Absorbancia de células tratadas} / \text{Absorbancia células control}) \times 100$$

Los resultados de las condiciones basales de las células se expresaron como 100% de viabilidad.

## 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Antes de realizar cualquier comparación estadística se comprobó mediante el test de Kolmogorov-Smirnoff si las variables estudiadas seguían una distribución normal dentro de cada población (SD, EA y respectivos controles). Para analizar las posibles diferencias en las variables de estudio entre los dos grupos de poblaciones (SD-control, EA-control) se utilizó el test del análisis de la varianza (ANOVA), junto con el contraste *post hoc* de la mínima diferencia significativa (LSD) cuando se realizaban comparaciones entre más de dos sub-grupos (comparaciones entre grupos de edad dentro de la misma población en SD o comparaciones entre diferentes agentes en tratamientos A y C para EA). Para el análisis de la influencia del sexo y de la edad en las variables estudiadas se tomó cada población de manera independiente. Para el análisis del factor 'Sexo' se utilizó el test ANOVA. Para el análisis del factor 'Edad' en SD se utilizó el test ANOVA y además, para completar el análisis, se realizó un test de correlación de Pearson. Este test de correlación se utilizó también para determinar si había alguna relación entre los valores de los parámetros de daño oxidativo en EA y la edad de los integrantes de la muestra poblacional. En el caso de las correlaciones significativas se realizó además un test de regresión lineal. Para comparar las variables de estudio entre los individuos con SD con o sin tratamiento para hipotiroidismo se realizó el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney. El análisis de las diferencias entre tratamientos para la variable porcentaje de viabilidad según MTT se realizó mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, dado que para las condiciones basales se utilizó el valor arbitrario de 100%. Se consideraron diferencias significativas cuando  $P < 0,05$  y muy significativas cuando  $P < 0,01$ . Los valores de todas

las variables están representados como Media  $\pm$  EEM (error estándar de la media).  
Todos los análisis se realizaron con el programa SPSS v.17.0 (SPSS Inc.).



## **IV. RESULTADOS**



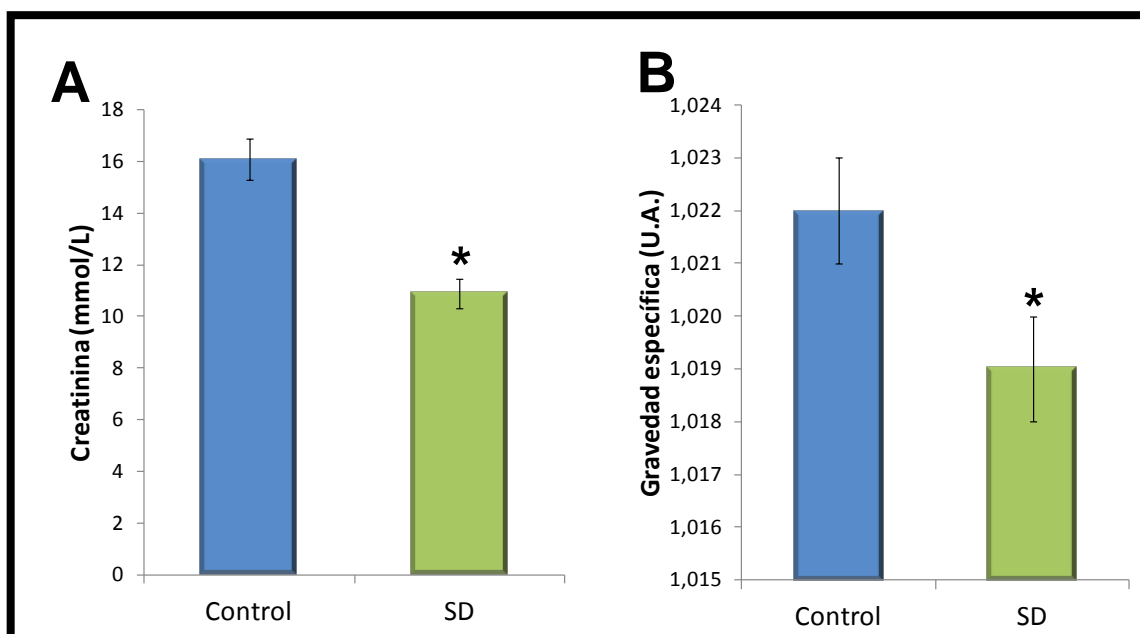


## 1. FUNCIÓN RENAL EN SD

El conocimiento actual que se tiene sobre la función renal en el SD se limita a problemas puntuales en los que tanto el número de individuos de estudio como su rango de edad es pequeño. Asimismo, debido a que la esperanza de vida en esta población ha ido creciendo en las últimas décadas (pudiendo alcanzar más de 55 años) existen pocos trabajos donde se analice esta función en personas con SD de edad avanzada, donde las probabilidades de que la misma esté deteriorada son mayores debido a los procesos de envejecimiento. Si además está descrito que existe un envejecimiento prematuro en estas personas debido a un elevado estrés oxidativo, resulta de gran interés analizar qué ocurre en la función renal en personas con SD de edad avanzada. Con objeto de profundizar en este apartado, se analizaron dos biomarcadores urinarios de función renal (Cr y GE) en una población con SD con un amplio rango de edad, relacionando los valores obtenidos con diferentes parámetros socio-demográficos (sexo, edad y dieta) así como con la presencia de hipotiroidismo. Además, los resultados se compararon con una población control sin ninguna patología neurodegenerativa asociada.

En primer lugar, se observó que las frecuencias normales para las distintas causas del SD se cumplían en la muestra poblacional estudiada, tal y como estableció Hook (1982) (ver apartado 3 de la Introducción). Los casos de trisomía regular suponían un 93,2%, mientras que aquellos que presentaban trisomía por translocación robertsoniana y mosaicismo fueron un 4,9% y un 1,9% respectivamente. Una vez realizada esta observación, se decidió analizar al grupo con SD sin tener en cuenta las causas que lo originaban, pues el número de individuos con translocaciones robertsonianas (n=5) y mosaicismo (n=2) era muy pequeño. Por tanto todas las comparaciones posteriores se realizaron tomando a todos los individuos con SD como un único grupo.

El análisis de los parámetros de función renal determinó que los valores de Cr y GE seguían una distribución normal tanto para la población con SD como para la población control. Posteriormente, la comparación de las concentraciones de Cr y los valores de GE en la orina permitió observar diferencias significativas entre ambas poblaciones, siendo menores los valores de los individuos con SD que los de aquellos de la población control (Figura 16). Esto podría indicar una función renal alterada en el grupo con SD, por lo que a continuación se analizan con detalle la influencia de diferentes factores en los valores urinarios de Cr y GE.



**Figura 16. Comparación de los parámetros de función renal en población control y con SD.**  
**A)** Concentración urinaria de creatinina ( $16,1 \pm 0,8$  vs.  $10,9 \pm 0,6$ .  $F=29,81$ ). **B)** Unidades arbitrarias de gravedad específica ( $1,022 \pm 0,001$  vs.  $1,019 \pm 0,001$ .  $F=9,27$ ). \* $P < 0,05$ .

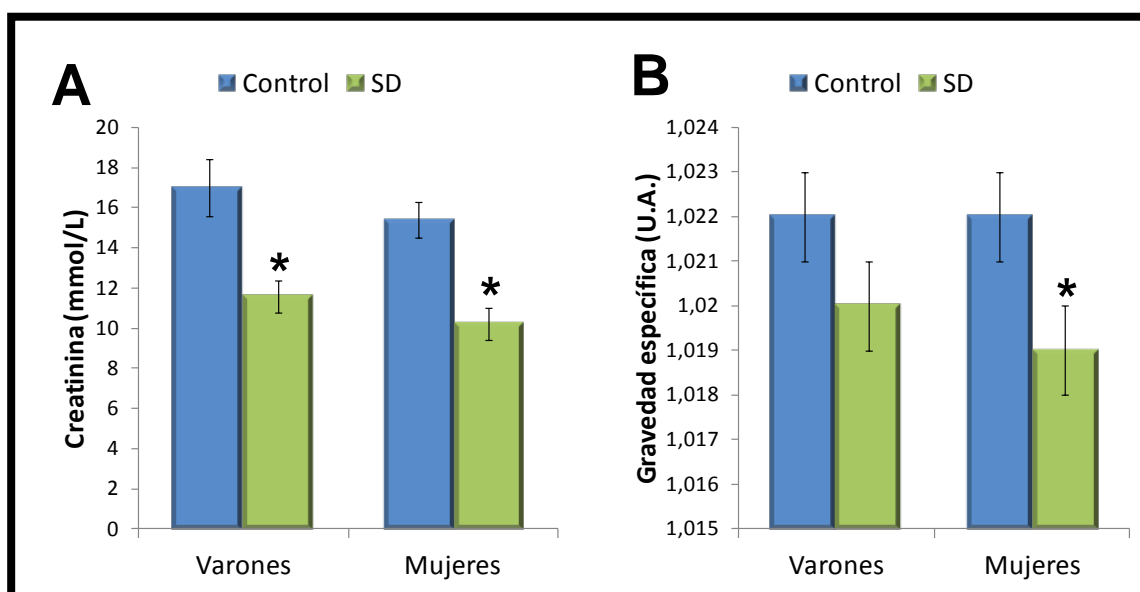
### 1.1. INFLUENCIA DE SEXO Y EDAD

Una vez analizados los parámetros de estudio en ambas poblaciones de manera general, se procedió al análisis de los parámetros socio-demográficos para evaluar su influencia sobre los valores de Cr y GE en ambas poblaciones.

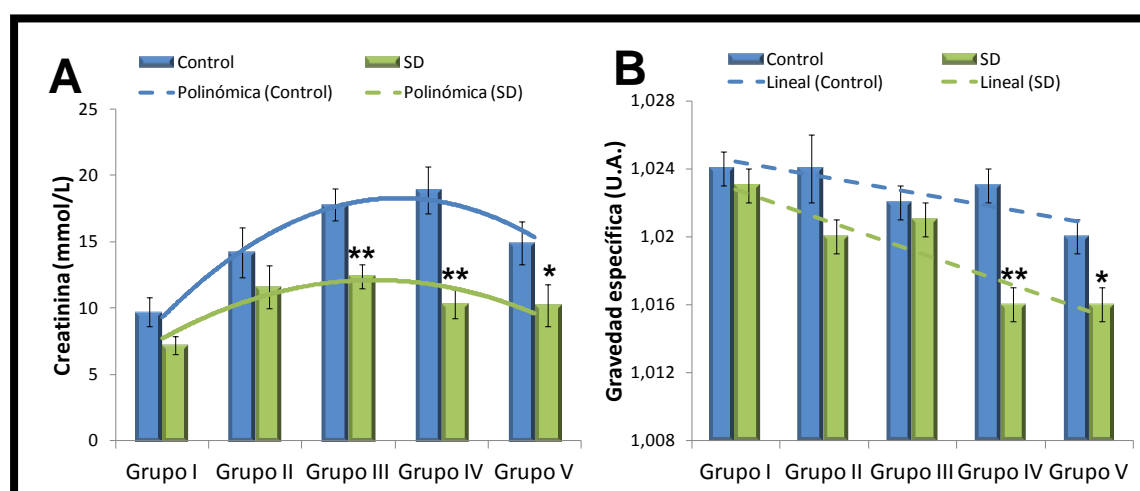
Las comparaciones entre sexos indicaron que no existían diferencias significativas entre hombres y mujeres en ambas poblaciones para los dos parámetros estudiados. Sin embargo, como era de esperar, sí se observaron diferencias dentro del mismo género al realizar las comparaciones entre poblaciones, excepto para la GE en varones (Figura 17).

El análisis del factor 'Edad' reveló diferencias significativas para la concentración de Cr y la GE entre la población control y la población con SD, dentro de algunos grupos de edad, sobre todo a partir de la edad adulta (Figura 18). Concretamente, para la Cr las diferencias fueron observadas en el grupo de edad III (16-25 años;  $F=12,47$ ), grupo IV (26-40 años;  $F=16,61$ ) y grupo V (>40 años;  $F=4,28$ ), mientras que para la GE las diferencias existían en el grupo IV ( $F=15,40$ ) y grupo V ( $F=4,76$ ). Además, se realizó una primera aproximación para estudiar las tendencias de los valores de las dos variables respecto de los grupos de edad. En la Figura 18 se puede observar cómo los valores de Cr se ajustaban mejor a una ecuación de segundo grado, siendo mejor el ajuste en la población control. Sin embargo, para la GE la tendencia era más propia de un ajuste lineal, donde la población con SD tenía

un ajuste mejor. Esto indica que, por un lado, los valores de Cr en SD alcanzan un máximo inferior al del grupo control y además comienzan a disminuir antes (como se puede observar en el grupo IV, donde la Cr del grupo control sigue incrementando). Por otro lado, los valores de GE muestran una disminución a medida que aumenta la edad, pero ésta es más acusada en SD. Estos datos podrían estar relacionados con el envejecimiento prematuro característico del SD.



**Figura 17. Comparación de los parámetros de función renal en ambas poblaciones en función del sexo. A)** Concentración urinaria de creatinina (Varones:  $17,0 \pm 1,4$  vs.  $11,6 \pm 0,8$ ;  $F=12,97$ . Mujeres:  $15,4 \pm 0,9$  vs.  $10,2 \pm 0,8$ ;  $F=17,96$ ). **B)** Unidades arbitrarias de gravedad específica (Varones:  $1,022 \pm 0,001$  vs.  $1,020 \pm 0,001$ ;  $F=2,47$ . Mujeres:  $1,022 \pm 0,001$  vs.  $1,019 \pm 0,001$ ;  $F=4,69$ ). \* $P < 0,05$ .



**Figura 18. Comparación de los parámetros de función renal entre población control (azul) y SD (verde) según grupos de edad.** En líneas punteadas se muestra la aproximación de ajuste según la tendencia de los valores de cada variable. **A)** Concentración urinaria de creatinina (Control:  $R^2=0,97$ ; SD:  $R^2=0,78$ ). **B)** Unidades arbitrarias de gravedad específica (Control:  $y=-0,0009x + 1,0253$ ;  $R^2=0,72$ . SD:  $y=-0,0018x + 1,0246$ ;  $R^2=0,84$ ). \* $P < 0,05$  y \*\* $P < 0,01$  respecto a población control en mismo grupo de edad. U.A.: unidades arbitrarias.

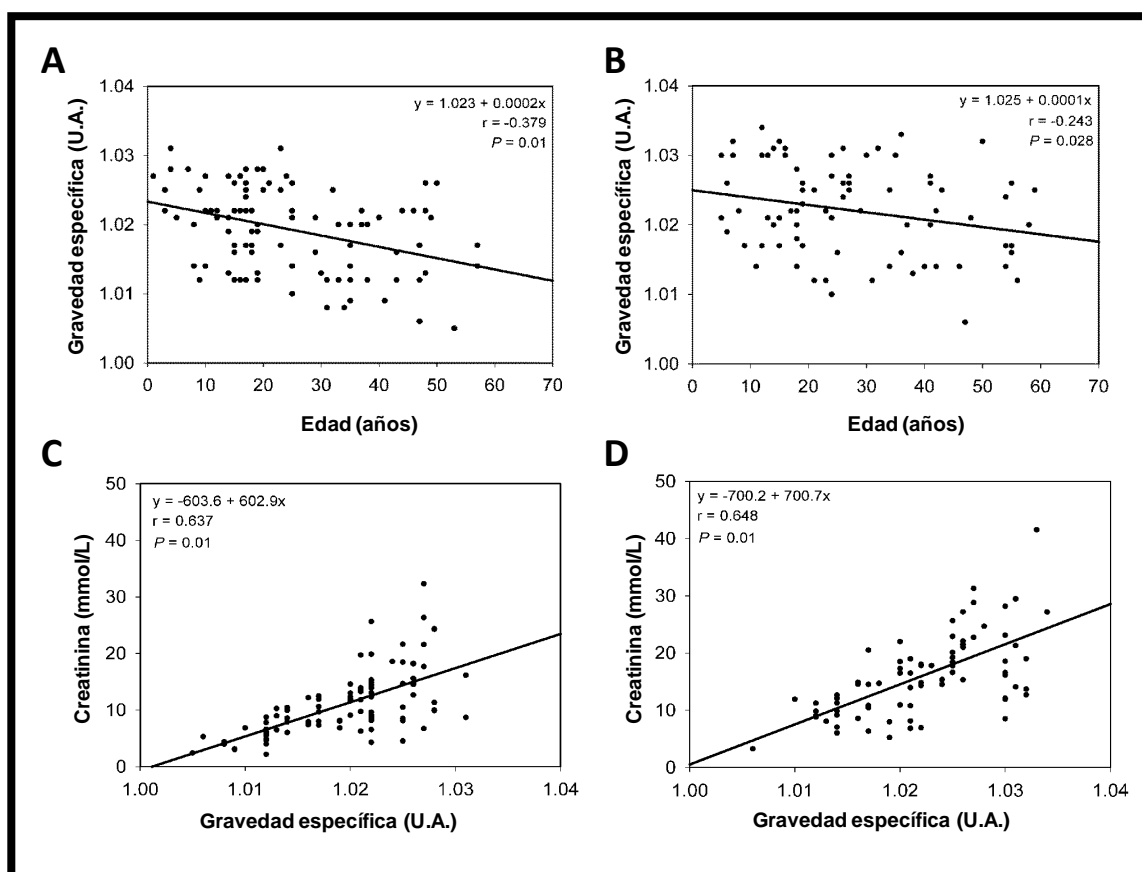
Adicionalmente, no sólo se observaron diferencias significativas entre poblaciones dentro del mismo grupo de edad, sino que también las hubo entre grupos de edad diferentes dentro de cada población (para Cr en la población control y para Cr y GE en SD) (Tabla 6).

**Tabla 6. Comparación de los parámetros de función renal entre grupos de edad dentro de la misma población.** \*P<0,05. 1: Grupo I vs Grupos II y III; 2: Grupo I vs Grupos III y IV; 3: Grupos I, II y III vs Grupos IV y V. U.A.: unidades arbitrarias.

Muestra Poblacional	Grupo de edad	N	Creatinina (mmol/L)	Gravedad específica (U.A.)
<b>Control</b>	<i>I (1-9 años)</i>	9	9,7 ± 1,1 * <sup>1</sup>	1,024 ± 0,001
	<i>II (10-15 años)</i>	11	14,2 ± 1,9	1,024 ± 0,002
	<i>III (16-25 años)</i>	22	17,8 ± 1,2	1,022 ± 0,001
	<i>IV (26-40 años)</i>	21	18,9 ± 1,8	1,023 ± 0,001
	<i>V (&gt;40 años)</i>	19	14,9 ± 1,6	1,020 ± 0,001
<b>SD</b>	<i>I (1-9 años)</i>	14	7,2 ± 0,7 * <sup>2</sup>	1,023 ± 0,001 * <sup>3</sup>
	<i>II (10-15 años)</i>	17	11,6 ± 1,6	1,020 ± 0,001 * <sup>3</sup>
	<i>III (16-25 años)</i>	37	12,4 ± 0,9	1,021 ± 0,001 * <sup>3</sup>
	<i>IV (26-40 años)</i>	19	10,3 ± 1,1	1,016 ± 0,001
	<i>V (&gt;40 años)</i>	16	10,2 ± 1,6	1,016 ± 0,001

Por último, para profundizar más en la relación de las variables estudiadas y el factor 'Edad' se analizó una posible relación directa entre la Cr y/o la GE y la edad de los individuos mediante un análisis de correlación de Pearson. En este caso se utilizaron los datos de edad brutos (sin separar en grupos).

En este estudio no se observaron correlaciones significativas (P>0,05) entre la Cr y la edad en ninguna de las dos poblaciones. Sin embargo, sí que se observó una correlación significativa negativa entre la GE y la edad tanto en población control como en población con SD ( $r=-0,243$  y  $r=-0,379$  respectivamente). Además, también se observaron correlaciones significativas positivas entre las concentraciones de Cr y los valores de GE en ambas poblaciones (Control:  $r=0,648$ ; SD:  $r=0,637$ ). La Figura 19 muestra los análisis de regresión de las correlaciones significativas.



**Figura 19. Modelos de regresión lineal de las correlaciones significativas. A)** Gravedad específica respecto edad en población con SD; **B)** Gravedad específica respecto edad en población control; **C)** Creatinina respecto a gravedad específica en población con SD; **D)** Creatinina respecto a gravedad específica en población control. U.A.: Unidades arbitrarias.

## 1.2. INFLUENCIA DE LA DIETA

El análisis del factor 'Dieta' permitió estudiar la influencia de la frecuencia de ingesta de diferentes tipos de alimentos en las dos variables de estudio (Cr y GE). Para ello se analizaron la ingesta de carne y derivados, la ingesta de frutas y verduras, la ingesta de lácteos y la ingesta de frutos secos. Debido a su alto contenido en creatina el estudio se centró en la ingesta de carne, cuyo análisis reveló que no existían diferencias significativas dentro de cada población entre aquellos individuos que comían carne a diario y aquellos que lo hacían entre 2 y 3 veces por semana (Tabla 7). Además, tampoco se observaron diferencias significativas respecto de la ingesta del resto de tipos de alimentos analizados en ambas poblaciones.

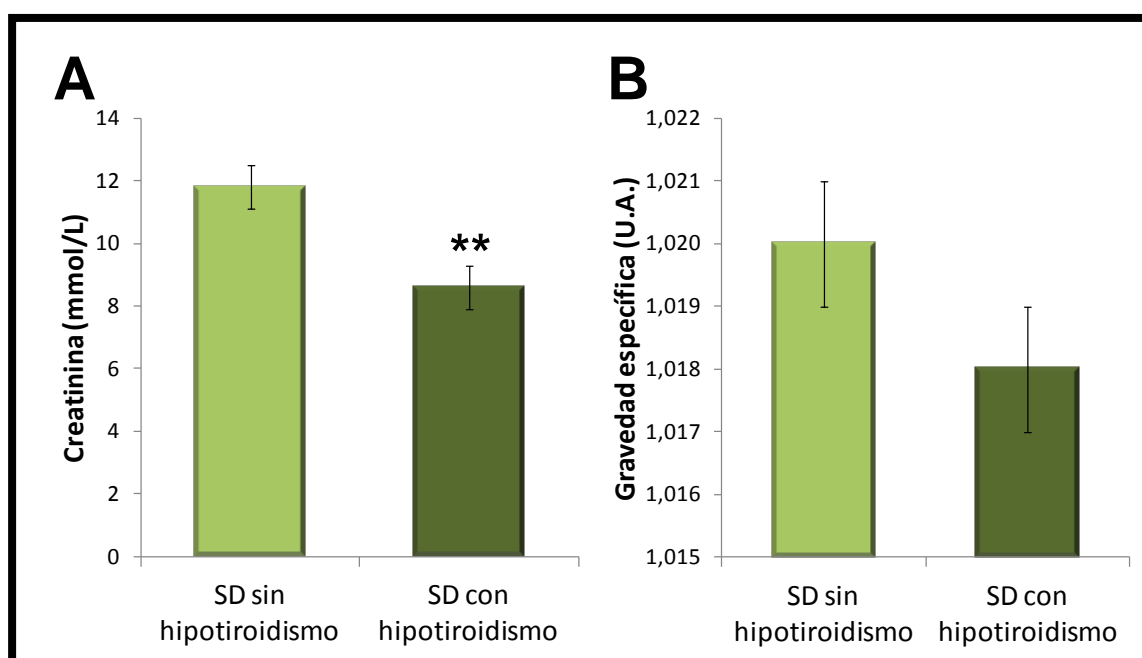
Tabla 7. Comparación de los parámetros de función renal en población control y población con SD según frecuencia de ingesta de carne y derivados. U.A.: unidades arbitrarias.

Muestra Poblacional	Frecuencia de ingesta	N	Creatinina (mmol/L)	Gravedad específica (U.A.)
<b>Control</b>	<i>Diariamente</i>	19	16,9 ± 1,5	1,023 ± 0,001
	<i>2-3 veces/semana</i>	58	15,9 ± 1,0	1,022 ± 0,001
<b>SD</b>	<i>Diariamente</i>	21	11,4 ± 1,3	1,021 ± 0,001
	<i>2-3 veces/semana</i>	80	10,7 ± 0,6	1,019 ± 0,001

### 1.3. INFLUENCIA DEL HIPOTIROIDISMO

Una vez analizada la influencia de los factores socio-demográficos en los parámetros de función renal se evaluó el factor 'Tratamiento para el hipotiroidismo'. Está descrito que el hipotiroidismo está presente en el 30-40% de personas con SD (van Allen *et al.*, 1999; Tüysüz y Beker, 2001; Barnhart y Connolly, 2007). La muestra poblacional estudiada cumplía con las frecuencias encontradas en la bibliografía, pues 31 personas con SD estaban siendo tratadas para el hipotiroidismo, lo que suponía un 30% respecto del total de personas con SD seleccionadas en la presente Tesis Doctoral. Concretamente, este grupo estaba tomando levotiroxina (4 en el Grupo de edad I, 5 en el Grupo II, 10 en el Grupo III, 8 en el Grupo IV y 4 en el Grupo V) como tratamiento para reemplazar el déficit de función tiroidea que presentaban.

El análisis de los parámetros de función renal puso de manifiesto que aquellos individuos con SD que recibían tratamiento con levotiroxina tenían niveles de Cr y GE más bajos que aquellos que no lo hacían, si bien estas diferencias sólo fueron significativas en el caso de la Cr (Figura 20). Cuando se trató de analizar estas diferencias según grupos de edad, se observó que sólo existían diferencias en el grupo de edad III (16-25 años) (Tabla 8), lo que indica que las diferencias encontradas entre ambos grupos son debidas en la mayor parte a las encontradas en este grupo de edad.



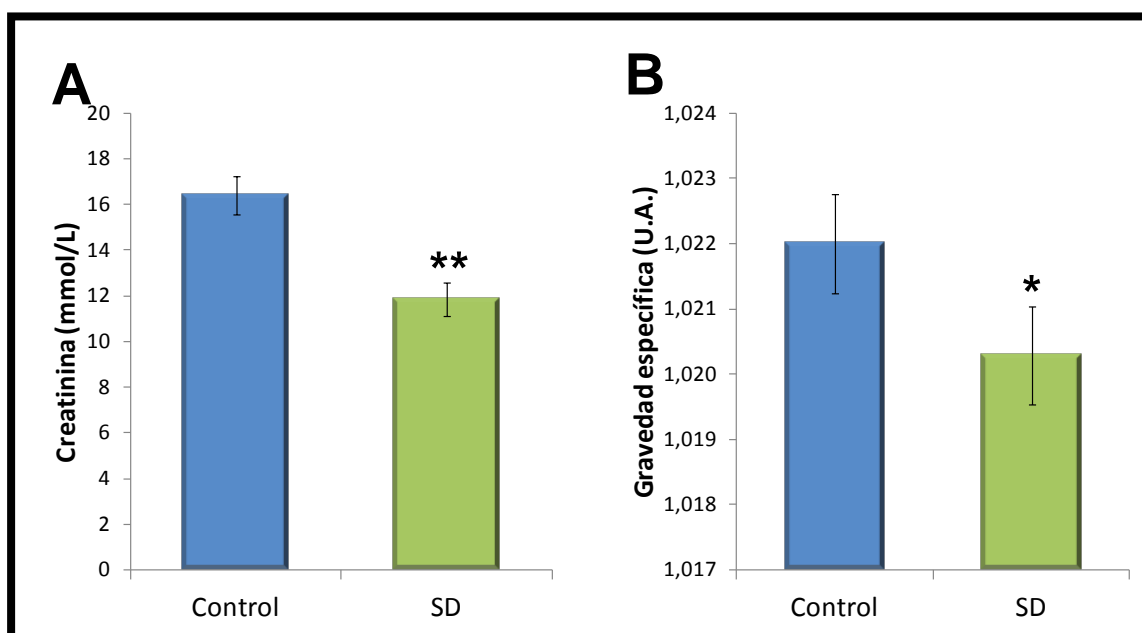
**Figura 20. Comparación de los parámetros de función renal en población con SD según tratamiento para hipotiroidismo. A)** Concentración urinaria de creatinina ( $11,8 \pm 0,7$  vs.  $8,6 \pm 0,7$ .  $F=7,15$ ) **B)** Unidades arbitrarias de gravedad específica ( $1,020 \pm 0,001$  vs.  $1,018 \pm 0,001$ .  $F=3,42$ ). \*\* $P < 0,01$ .

**Tabla 8. Comparación de los parámetros de función renal entre grupos de edad dentro de la población con SD en función del tratamiento para hipotiroidismo. U.A.: unidades arbitrarias. \* $P < 0,05$  respecto al mismo grupo de edad.**

Muestra poblacional	Grupo de edad	N	Creatinina (mmol/L)	Gravedad específica (U.A.)
SD con hipotiroidismo	I (1-9 años)	4	$6,2 \pm 0,9$	$1,022 \pm 0,003$
	II (10-15 años)	5	$9,3 \pm 1,4$	$1,020 \pm 0,001$
	III (16-25 años)	10	$8,0 \pm 1,0$ *	$1,018 \pm 0,002$
	IV (26-40 años)	8	$9,6 \pm 1,9$	$1,015 \pm 0,002$
	V (>40 años)	4	$9,5 \pm 3,2$	$1,015 \pm 0,003$
SD sin hipotiroidismo	I (1-9 años)	10	$7,5 \pm 0,9$	$1,024 \pm 0,002$
	II (10-15 años)	12	$12,6 \pm 2,2$	$1,020 \pm 0,002$
	III (16-25 años)	27	$14 \pm 1,1$	$1,022 \pm 0,001$
	IV (26-40 años)	11	$10,8 \pm 1,4$	$1,016 \pm 0,001$
	V (>40 años)	12	$10,4 \pm 1,9$	$1,016 \pm 0,002$



Por último, se excluyeron los individuos con tratamiento para el hipotiroidismo para repetir la comparación de los parámetros de función renal entre la población control y la población con SD, y se observó que las diferencias entre ambas poblaciones seguían manteniéndose (Figura 21). Estos datos revelan que las diferencias encontradas entre el grupo con SD y el grupo control no pueden ser explicadas únicamente por el hipotiroidismo del SD, sino que existe otra posible causa de estas diferencias, lo que refuerza la hipótesis de una posible función renal dañada en SD.



**Figura 21. Comparación de los parámetros de función renal en población control y con SD después de excluir dentro de la población con SD a aquellos individuos que se medicaban para el hipotiroidismo. A)** Concentración urinaria de creatinina ( $16,1 \pm 0,8$  vs.  $11,9 \pm 0,8$ ;  $F=15,98$ ). **B)** Unidades arbitrarias de gravedad específica ( $1,022 \pm 0,001$  vs.  $1,020 \pm 0,001$ ;  $F=4,46$ ). \* $P < 0,05$  y \*\* $P < 0,01$ .

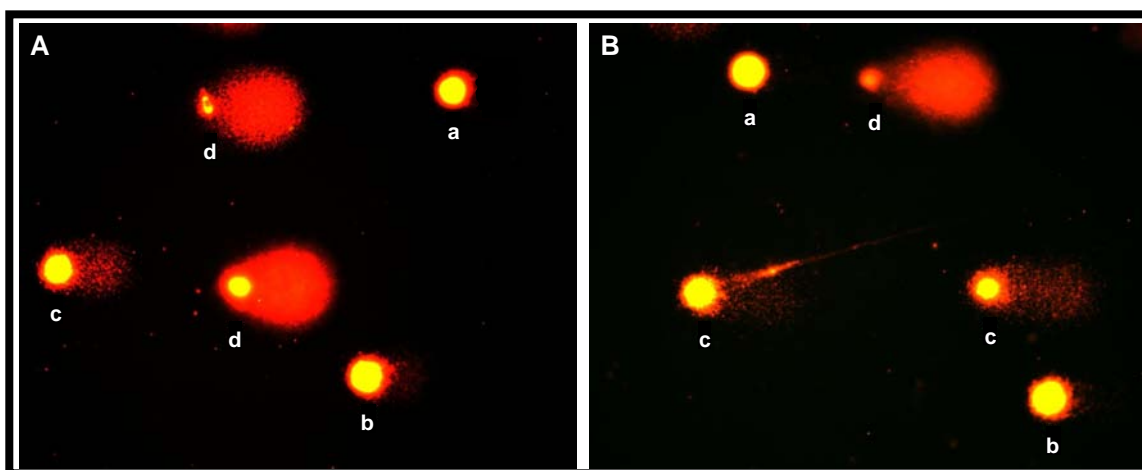
## 2. DAÑO OXIDATIVO EN PACIENTES CON EA

La implicación del estrés oxidativo en la patogénesis y el desarrollo de la EA está ampliamente descrita en la bibliografía. Además, el elevado estrés oxidativo presente en la enfermedad no se observa sólo en el cerebro de estos pacientes, sino también en tejidos periféricos, como la sangre, pudiéndose observar alteraciones sistémicas de más fácil estudio que las relacionadas con los tejidos neurales. Con objeto de estudiar el estatus oxidativo de una población con EA, se seleccionaron diferentes biomarcadores de daño oxidativo a diferentes biomoléculas, ADN, proteínas

y glúcidos; así como biomarcadores que determinan el nivel de defensa antioxidante del plasma sanguíneo. Además, los resultados obtenidos se compararon con una población control del mismo rango de edad sin EA.

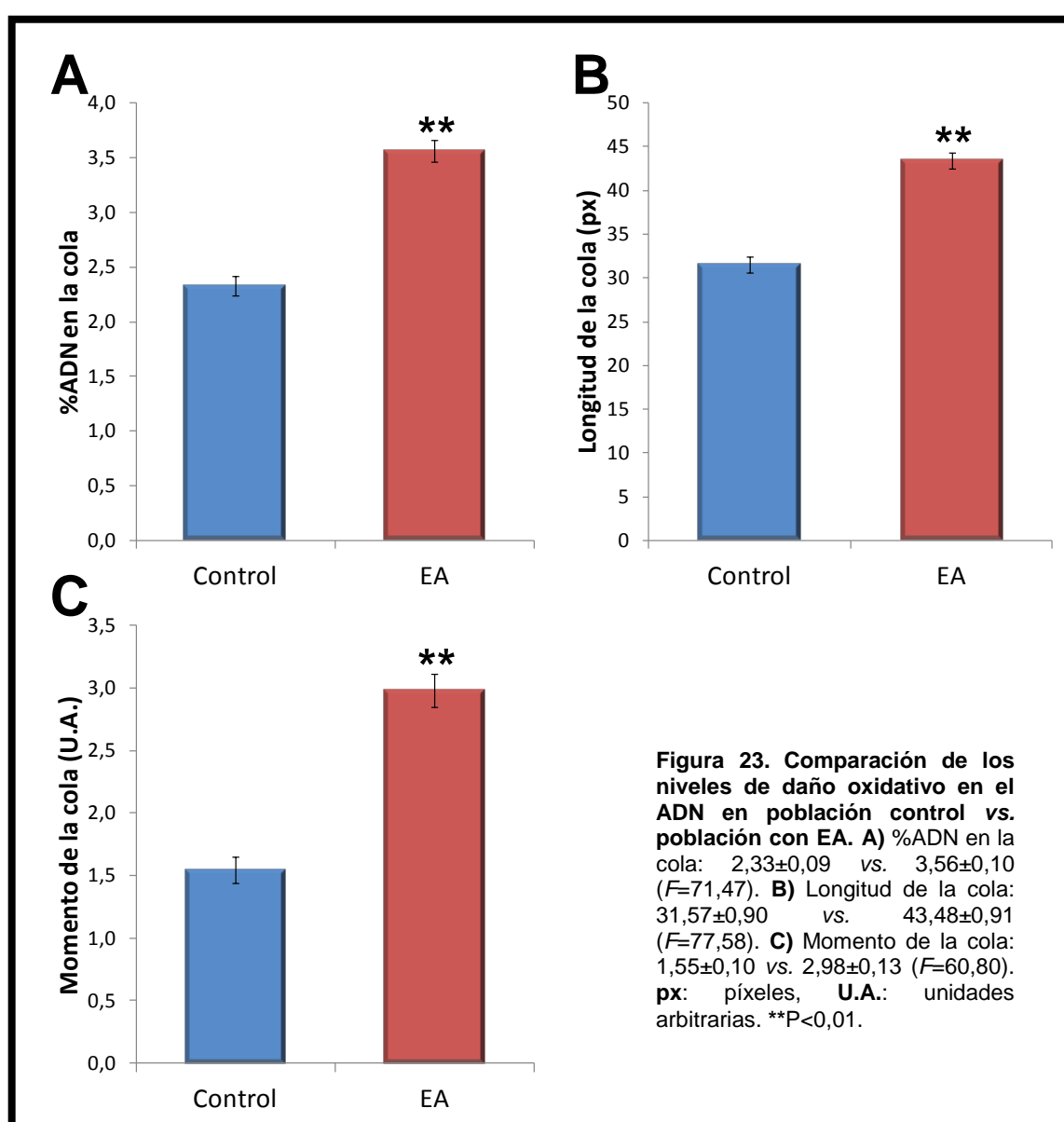
### 2.1. DAÑO OXIDATIVO AL ADN

En la Figura 22 se observan las cuatro tipologías de cometas que se pueden encontrar en las preparaciones. Cabe destacar que lo más común es encontrarse casi siempre con todas ellas, si bien dependiendo de la tipología abundante encontrada los resultados cuantitativos serán diferentes. El cometa casi sin daño (a) se caracteriza por no presentar cola o a veces una leve sombra que se corresponde con un nivel de daño en el ADN muy bajo. El siguiente tipo de cometa (b) presenta una cola bien diferenciada, pero corta respecto de los tipos de cometa siguientes. En este caso existe daño en el ADN, aunque este es escaso. El siguiente tipo de cometa (c) ya presenta un daño al ADN medio-alto, y se puede observar cómo la cola suele tener una longitud mayor a la de la cabeza del cometa, si bien la intensidad de la misma puede variar (resultando que a mayor intensidad de la cola, mayor %DNA en la en la misma). Por último, aparece otra tipología llamada célula fantasma o *ghost cell* (d), que se caracteriza por tener la cola más ancha que la cabeza del cometa. Estos cometas proceden de células muertas y no se tuvieron en cuenta a la hora de realizar los análisis de las muestras.



**Figura 22. Tipologías de cometas encontradas en dos preparaciones diferentes (A y B).** a) nucleóide casi sin daño en el ADN; b) nucleóide con poco daño en el ADN; c) nucleóide con daño medio-alto en el ADN; d) célula fantasma.

El análisis de los datos obtenidos de las fotografías realizadas a cada muestra, determinó que los valores de las tres variables estudiadas (%ADN, Longitud y Momento) siguieron una distribución normal en ambas poblaciones (EA: %ADN,  $Z=0,70$ ; Longitud,  $Z=0,62$ ; Momento,  $Z=0,98$ . Control: %ADN,  $Z=0,99$ ; Longitud,  $Z=0,90$ ; Momento,  $Z=0,95$ . Todos los test con  $P>0,05$ ). Los valores de estas tres variables fueron significativamente mayores en la población con EA respecto de la población control (Figura 23) por lo que se puede inferir que el daño oxidativo en el ADN de esta población analizada es significativamente más elevado.



El estudio de las 3 variables en relación al sexo de los individuos determinó que no existían diferencias significativas ni en la población con EA ni en la población control. Sin embargo, al analizar las diferencias entre poblaciones divididas según el sexo sí se observó que existían diferencias significativas entre varones para las 3 variables, pero no entre las mujeres (Tabla 9). Esto indica que las diferencias encontradas entre ambas poblaciones, representadas en la Figura 23, son debidas sobre todo a las diferencias entre los varones de ambas poblaciones.

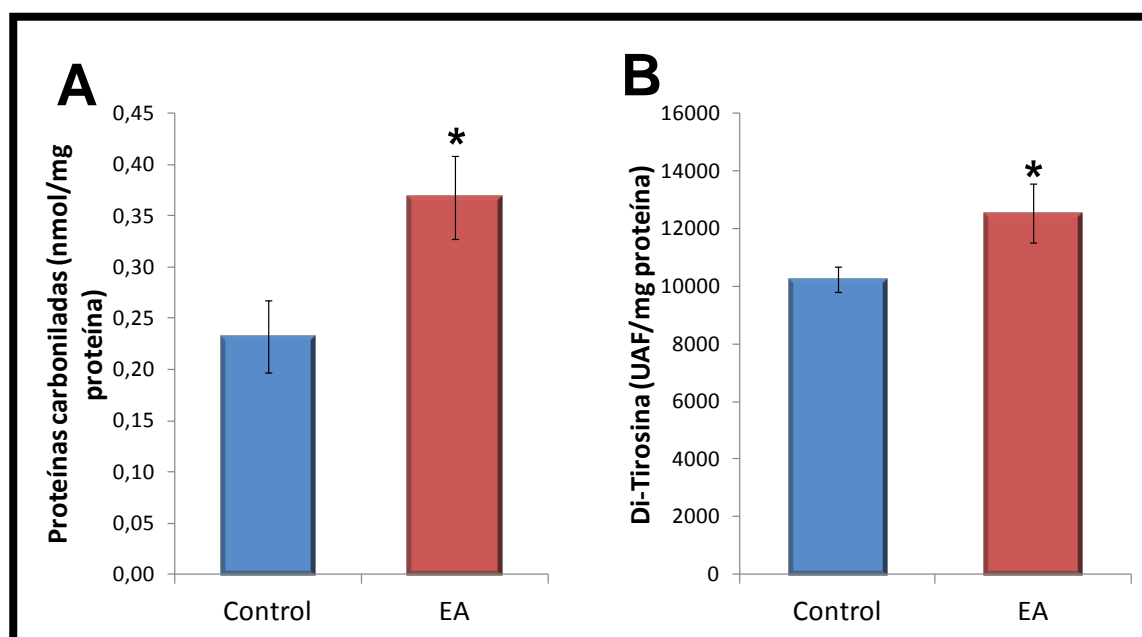
**Tabla 9. Valores de daño oxidativo al ADN en ambas poblaciones divididas según el sexo de los individuos.** \*P<0,05 respecto de varones del grupo control; px: píxeles; U.A.: Unidades arbitrarias.

Muestra Poblacional	Sexo	%ADN (%)	Longitud (px)	Momento (U.A.)
Control	Varones	2,31 ± 0,36	33,41 ± 4,30	1,54 ± 0,39
	Mujeres	3,65 ± 1,16	41,71 ± 9,48	3,09 ± 1,61
EA	Varones	4,10 ± 0,55 *	52,09 ± 5,58 *	3,71 ± 0,80 *
	Mujeres	3,34 ± 0,39	39,90 ± 4,04	2,68 ± 0,48

Por último, los resultados del test de correlación indicaron que no existía relación alguna entre ninguna de las 3 variables y la edad de los individuos (EA: %ADN,  $\rho_{x,y}=-0,23$ ; Longitud,  $\rho_{x,y}=-0,37$ ; Momento,  $\rho_{x,y}=-0,32$ . Control: %ADN,  $\rho_{x,y}=0,27$ ; Longitud,  $\rho_{x,y}=0,32$ ; Momento,  $\rho_{x,y}=0,28$ . Todos los test con  $P>0,05$ ).

## 2.2. DAÑO OXIDATIVO A PROTEÍNAS

En el caso de las determinaciones de daño oxidativo a proteínas, tanto los valores de proteínas carboniladas como los de di-tirosina siguieron una distribución normal en ambas poblaciones (EA:  $Z=1,14$ ; Control:  $Z=0,69$  para proteínas carboniladas. EA:  $Z=1,16$ ; Control:  $Z=0,32$  para di-tirosina. Todos  $P>0,05$ ). En ambos parámetros, las concentraciones de las personas con EA fueron significativamente más elevadas que en la población control (Figura 24). Estos resultados indicarían que la población con EA no sólo posee un daño oxidativo mayor en el ADN, sino que también estarían más dañadas las proteínas de su plasma sanguíneo.



**Figura 24. Comparación de los niveles de daño oxidativo a proteínas en población control vs. población con EA. A)** Proteínas carboniladas:  $0,23 \pm 0,04$  vs.  $0,37 \pm 0,04$  ( $F=5,61$ ); **B)** Di-Tirosina:  $10246 \pm 424$  vs.  $12537 \pm 1018$  ( $F=5,10$ ). \* $P < 0,05$ . UAF: unidades arbitrarias de fluorescencia.

La comparación entre sexos no reveló diferencias significativas entre varones y mujeres, ni en las proteínas carboniladas ni en la di-tirosina, en ninguna de las dos poblaciones estudiadas ( $P > 0,05$ ). Sin embargo, sí que se hallaron diferencias significativas entre poblaciones para cada sexo, excepto en los niveles de di-tirosina entre mujeres con EA y control (Tabla 10). En este caso, los resultados indican que las diferencias existentes entre EA y grupo control en los grupos carbonilo no dependen del sexo de los individuos, mientras que para la di-tirosina parece que influyen más los valores encontrados en los varones.

**Tabla 10. Valores de daño oxidativo a proteínas en ambas poblaciones divididas según el sexo de los individuos.** \* $P < 0,05$  y \*\* $P < 0,01$  respecto a individuos del mismo sexo de población control. UAF: unidades arbitrarias de fluorescencia.

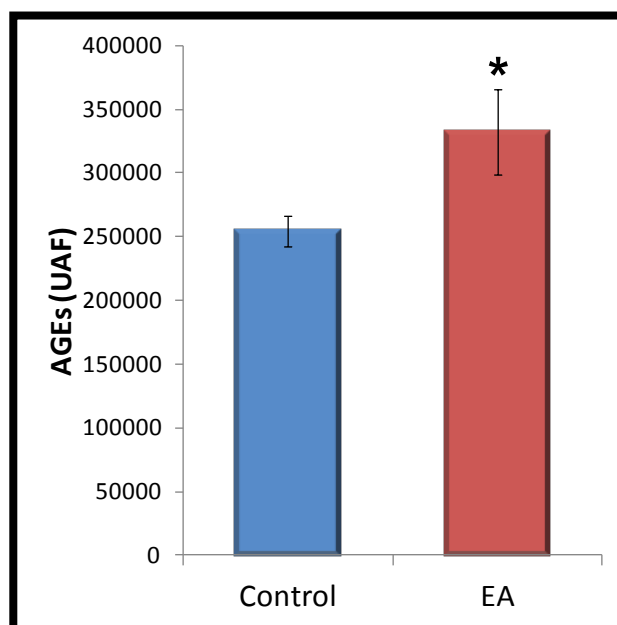
Muestra Poblacional	Sexo	Grupos carbonilo (nmol/mg prot)	Di-Tirosina (UAF/mg prot)
Control	Varones	$0,21 \pm 0,04$	$10412 \pm 495$
	Mujeres	$0,26 \pm 0,06$	$9956 \pm 819$
EA	Varones	$0,36 \pm 0,07$ **	$15146 \pm 3019$ *
	Mujeres	$0,38 \pm 0,05$ **	$11450 \pm 625$

En cuanto a la relación de los valores de daño oxidativo a proteínas con la edad, los resultados del test de correlación indicaron que no existía relación alguna entre ninguno de los dos parámetros (proteínas carboniladas y di-tirosina) y la edad de los individuos en ambas poblaciones (EA:  $\rho_{x,y}=-0,02$ ; Control:  $\rho_{x,y}=0,46$  para proteínas carboniladas. EA:  $\rho_{x,y}=0,30$ ; Control:  $\rho_{x,y}=-0,16$  para di-tirosina.  $P>0,05$ ).

### 2.3. DAÑO OXIDATIVO POR GLICOXIDACIÓN

Para finalizar con las determinaciones de biomarcadores de daño oxidativo en sangre en la muestra poblacional con EA y su respectivo grupo control se analizó la cantidad de AGEs presente en las muestras de plasma. Tras comprobar que los valores de AGEs seguían una distribución normal en ambas poblaciones (EA:  $Z=1,07$ ; Control:  $Z=0,46$ . Ambos  $P>0,05$ ) se observó que la población con EA tenía unas concentraciones de este biomarcador significativamente más elevadas respecto de la población control (Figura 25), por lo que el daño por glicoxidación también era mayor en el plasma de la muestra poblacional con EA.

La comparación entre sexos no reveló diferencias significativas en ninguna de las dos poblaciones estudiadas. Además, tampoco existieron diferencias entre personas del mismo sexo al comparar ambas poblaciones ( $P>0,05$ ) (Tabla 11).



**Figura 25. Comparación de los niveles de daño oxidativo por glicoxidación en población control vs. población con EA.** Productos de glicación avanzada (AGEs): 254468±11982 vs. 332185±33368 ( $F=4,81$ ). \* $P<0,05$ . UAF: unidades arbitrarias de fluorescencia.

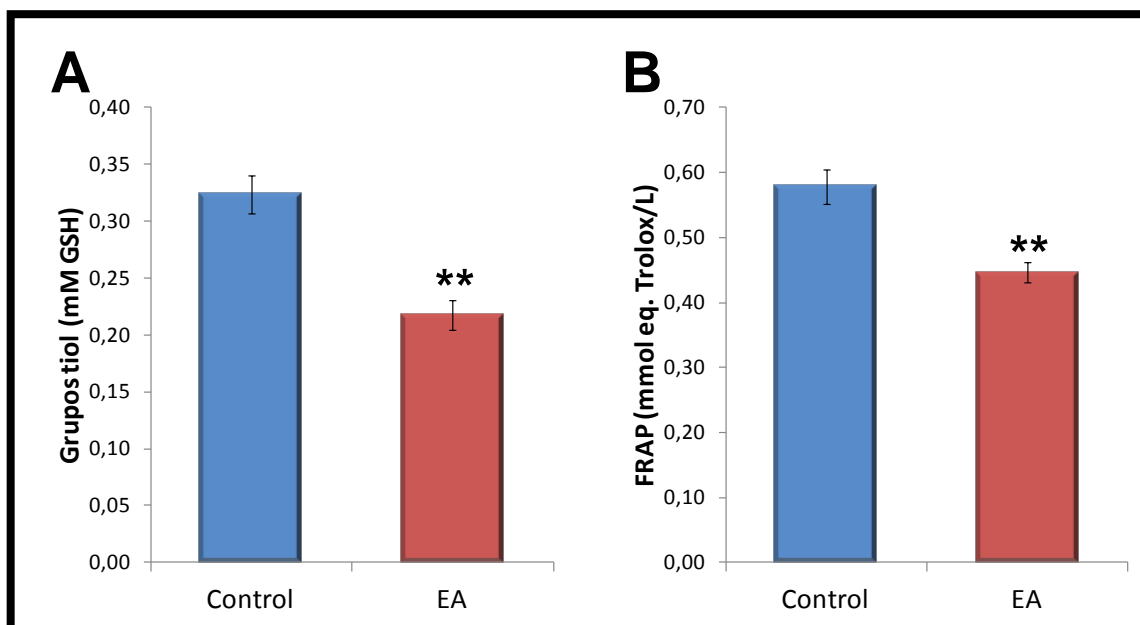
**Tabla 11. Valores de daño oxidativo por glicoxidación (AGEs) en ambas poblaciones divididas según el sexo de los individuos. UAF: Unidades arbitrarias de fluorescencia.**

<b>Muestra Poblacional</b>	<b>Sexo</b>	<b>AGEs (UAF)</b>
<b>Control</b>	<i>Varones</i>	244761 ± 14210
	<i>Mujeres</i>	272495 ± 21581
<b>EA</b>	<i>Varones</i>	285078 ± 14199
	<i>Mujeres</i>	352375 ± 46766

Por último, los resultados del test de correlación de Pearson indicaron que no existía relación alguna entre los valores de AGEs y la edad de los individuos en ambas poblaciones ( $P > 0,05$ ).

## 2.4. ESTATUS ANTIOXIDANTE

A continuación se determinaron los parámetros de estatus antioxidante en el plasma sanguíneo. Los valores obtenidos en la determinación de  $-SH$  y de la capacidad antioxidante mediante FRAP en ambas poblaciones seguían una distribución normal (EA:  $Z=0,67$ ; Control:  $Z=0,80$  para  $-SH$ . EA:  $Z=0,48$ ; Control:  $Z=0,90$  para capacidad antioxidante. Ambos  $P > 0,05$ ). La comparación entre la muestra con EA y el grupo control reveló que, tanto los valores de  $-SH$ , como la capacidad antioxidante del plasma, eran significativamente menores en la población con EA respecto de la población control (Figura 26). Esto indicaría que las personas con EA no sólo tienen más elevados los niveles de biomarcadores de daño oxidativo en sangre, sino que además, su capacidad para poder hacer frente a ese aumento de estrés oxidativo está disminuida, probablemente por acción directa de los propios RL y ROS que generan el daño oxidativo en su organismo.



**Figura 26. Comparación de los niveles de estatus antioxidante en población control vs. población con EA. A)** Grupos tiol:  $0,32 \pm 0,02$  vs.  $0,22 \pm 0,01$  ( $F=25,29$ ); **B)** FRAP:  $0,58 \pm 0,03$  vs.  $0,45 \pm 0,02$  ( $F=18,31$ ). \*\* $P < 0,01$ .

El análisis de la posible influencia del factor 'Sexo' sobre los valores de los dos parámetros de estatus antioxidante indicó que no existían diferencias significativas en ninguna de las dos poblaciones para ambas variables ( $P > 0,05$ ). No obstante, cuando la comparación se realizó entre población EA y control separando sexos, sí que se obtuvieron diferencias significativas. En este caso, tanto varones como mujeres con EA tenían niveles de -SH y capacidad antioxidante del plasma significativamente menores que la población control, lo que sugiere que las diferencias encontradas no dependen del sexo de los individuos analizados (Tabla 12).

**Tabla 12. Valores de grupos tiol y capacidad antioxidante en ambas poblaciones divididas según el sexo de los individuos.** \* $P < 0,05$  y \*\* $P < 0,01$  respecto de individuos del mismo sexo del grupo control.

Muestra Poblacional	Sexo	Grupos tiol (mmoles/L)	Capacidad antioxidante (mmoles equiv. Trolox/L)
Control	Varones	$0,31 \pm 0,02$	$0,57 \pm 0,03$
	Mujeres	$0,36 \pm 0,04$	$0,59 \pm 0,06$
EA	Varones	$0,22 \pm 0,02$ **	$0,44 \pm 0,02$ *
	Mujeres	$0,21 \pm 0,02$ **	$0,45 \pm 0,02$ **



Para finalizar, los análisis de correlación con la edad no mostraron que existiera ninguna relación significativa en ambas poblaciones (EA:  $\rho_{x,y}=-0,16$ ; Control:  $\rho_{x,y}=-0,08$  para  $-SH$ . EA:  $\rho_{x,y}=0,29$ ; Control:  $\rho_{x,y}=0,25$  para capacidad antioxidante.  $P>0,05$  en todos), al igual que el resto de parámetros analizados anteriormente.

### **3. ESTUDIO DE LOS EFECTOS ANTIOXIDANTES DEL AS EN EA**

El uso de antioxidantes como posible terapia en EA está siendo ampliamente estudiado debido a la alta influencia del estrés oxidativo en la patología. Se han investigado multitud de compuestos de diversa naturaleza, siendo las vitaminas y nutrientes los más empleados, ya que muchos son de fácil absorción y ejercen otros efectos beneficiosos en el organismo. Por otro lado, el AS es un agua minero-medicinal con propiedades antioxidantes basadas en su composición, pues tiene un alto contenido en  $H_2S$ . Esta molécula no sólo interactúa directamente con RL y ROS, sino que también puede servir de fuente para la síntesis de GSH. En la actualidad se han realizado estudios en los que se demuestra el efecto beneficioso del AS, pero no existen trabajos que aporten sus beneficios en biomarcadores de daño oxidativo a ADN ni en población con EA. Con objeto de contribuir al estudio de nuevos compuestos que ayuden a reducir el estrés oxidativo de estos pacientes y mejoren su calidad de vida, se realizó una aproximación terapéutica *in vitro* del AS en CMSP de personas con EA, relacionando el daño oxidativo al ADN con su viabilidad celular, y comparando los resultados obtenidos con 3 antioxidantes de referencia, tanto en pacientes con EA como en su correspondiente grupo control.

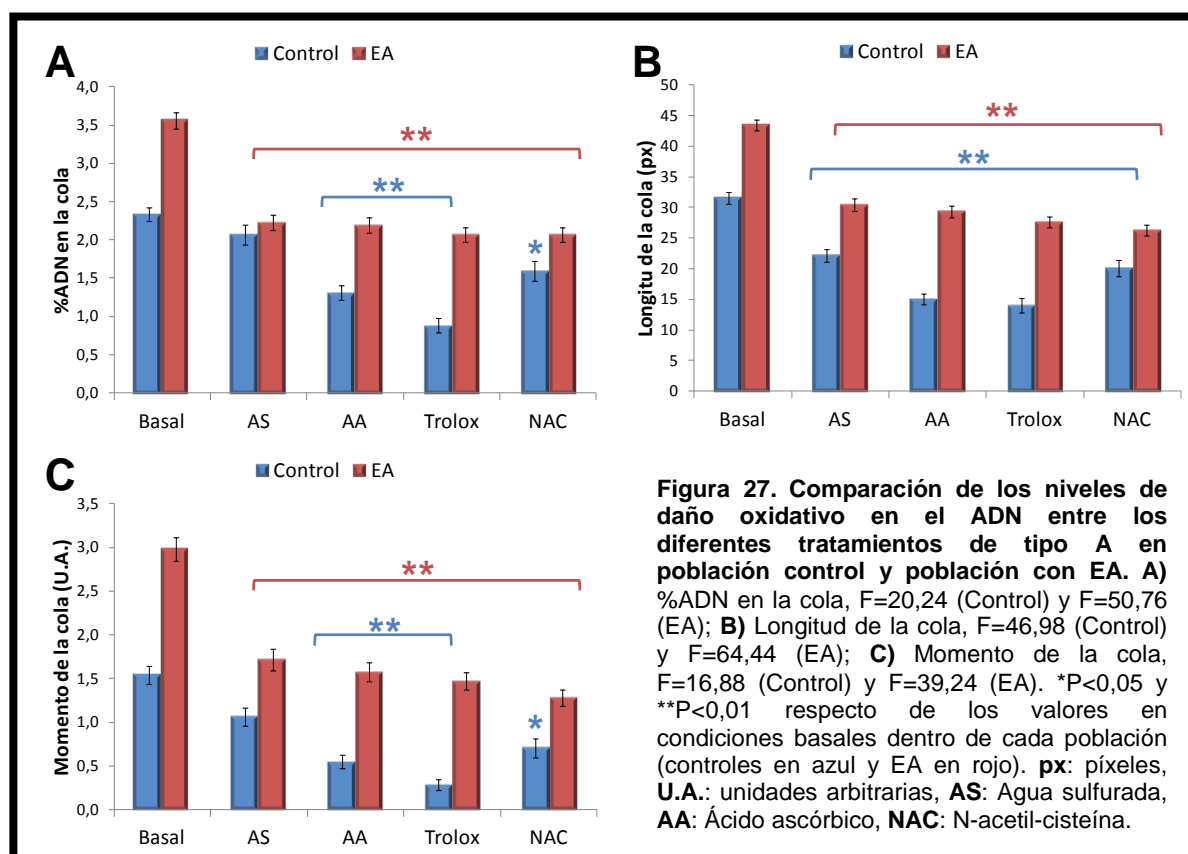
#### **3.1. ANÁLISIS PREVIO DE AGENTES ANTIOXIDANTES EN CMSP DE EA (TRATAMIENTOS A)**

Para determinar que los antioxidantes utilizados no generaban un daño oxidativo *per se*, las CMSP se sometieron a un tratamiento de incubación con los cuatro agentes seleccionados (AS, AA, Trolox y NAC). El análisis de los parámetros de daño oxidativo al ADN (%ADN, Longitud y Momento) reveló que seguían una distribución normal para los cuatro tratamientos en ambas poblaciones (Tabla 13).

**Tabla 13. Análisis de distribución de los datos de daño oxidativo al ADN para los 4 tratamientos de tipo A en población con EA y población control. Todos los análisis resultaron no significativos ( $P < 0,05$ ).**

	Variable	Tratamiento (valores de Z)			
		AS	AA	Trolox	NAC
CONTROL	%ADN	0,73	0,76	0,32	0,41
	Longitud	0,62	0,37	0,55	0,56
	Momento	0,76	0,56	0,39	0,56
EA	%ADN	0,53	1,13	0,71	1,00
	Longitud	0,68	0,87	0,81	0,88
	Momento	0,75	1,26	0,90	0,76

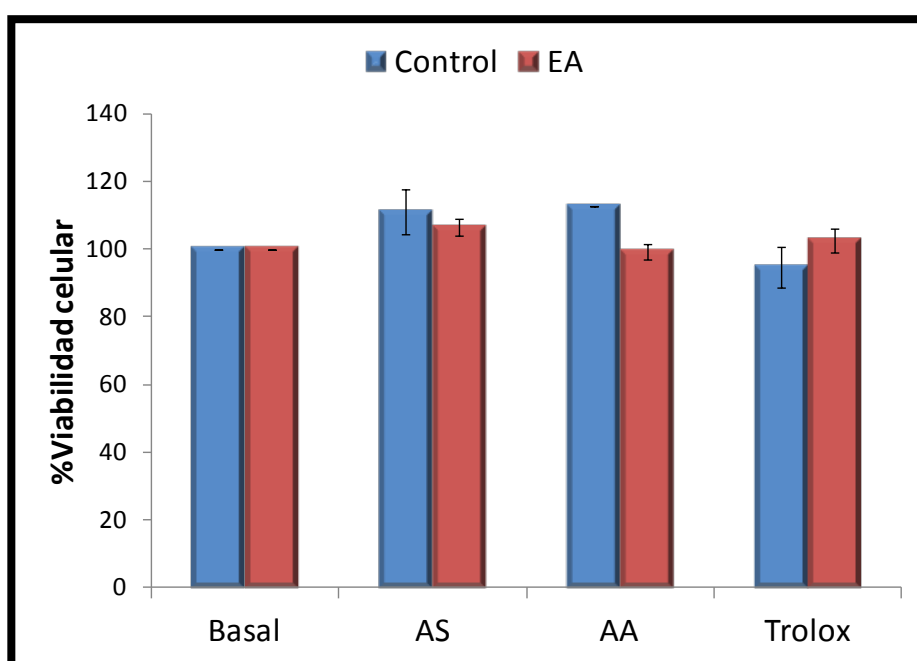
La comparación entre tratamientos para las tres variables indicó que ni el tratamiento con AS ni ninguno de los tratamientos con los antioxidantes de referencia generaba valores más elevados que aquellos determinados en la condición basal de los individuos. Es más, incluso algunos tratamientos disminuían significativamente los valores respecto de la condición basal (Figura 27). Además, también se observaron diferencias entre los tratamientos dentro de cada población (Tabla 14).



**Tabla 14. Valores de daño oxidativo al ADN para los 4 tratamientos de tipo A en población con EA y población control.** %: porcentaje; **px**: píxeles; **U.A.**: unidades arbitrarias. **AS**: Agua sulfurada, **AA**: Ácido ascórbico, **NAC**: N-acetil-cisteína. \*P<0,05 y \*\*P<0,01. Comparaciones entre tratamientos: 1: AS vs. AA; 2: AS vs. Trolox; 3: AS vs. NAC.

	Variable	Tratamiento			
		AS	AA	Trolox	NAC
CONTROL	%ADN (%)	2,06±0,13**1,2	1,31±0,10	0,89±0,10	1,59±0,13
	Longitud (px)	22,16±1,05**1,2	15,07±0,87	14,03±1,19	20,06±1,29
	Momento (U.A.)	1,06±0,10	0,55±0,08	0,28±0,06	0,71±0,11
EA	%ADN (%)	2,23±0,10	2,19±0,10	2,07±0,10	2,07±0,10
	Longitud (px)	30,45±1,06*3	29,39±1,00	27,67±0,91	26,36±0,90
	Momento (U.A.)	1,72±0,12	1,58±0,11	1,47±0,10	1,28±0,10

La determinación de la viabilidad celular de las CMSP por MTT no reveló diferencias significativas de ningún tratamiento de tipo A respecto de las condiciones basales ( $\chi^2=4,29$  para población control  $\chi^2=3,20$  para población con EA;  $P>0,05$ ) (Figura 28). Esto sugiere que, tal como cabría esperar, ningún antioxidante produce *per se* daño oxidativo al ADN en las CMSP, ni tampoco disminuye su viabilidad, tanto en la muestra poblacional con EA como en el grupo control.

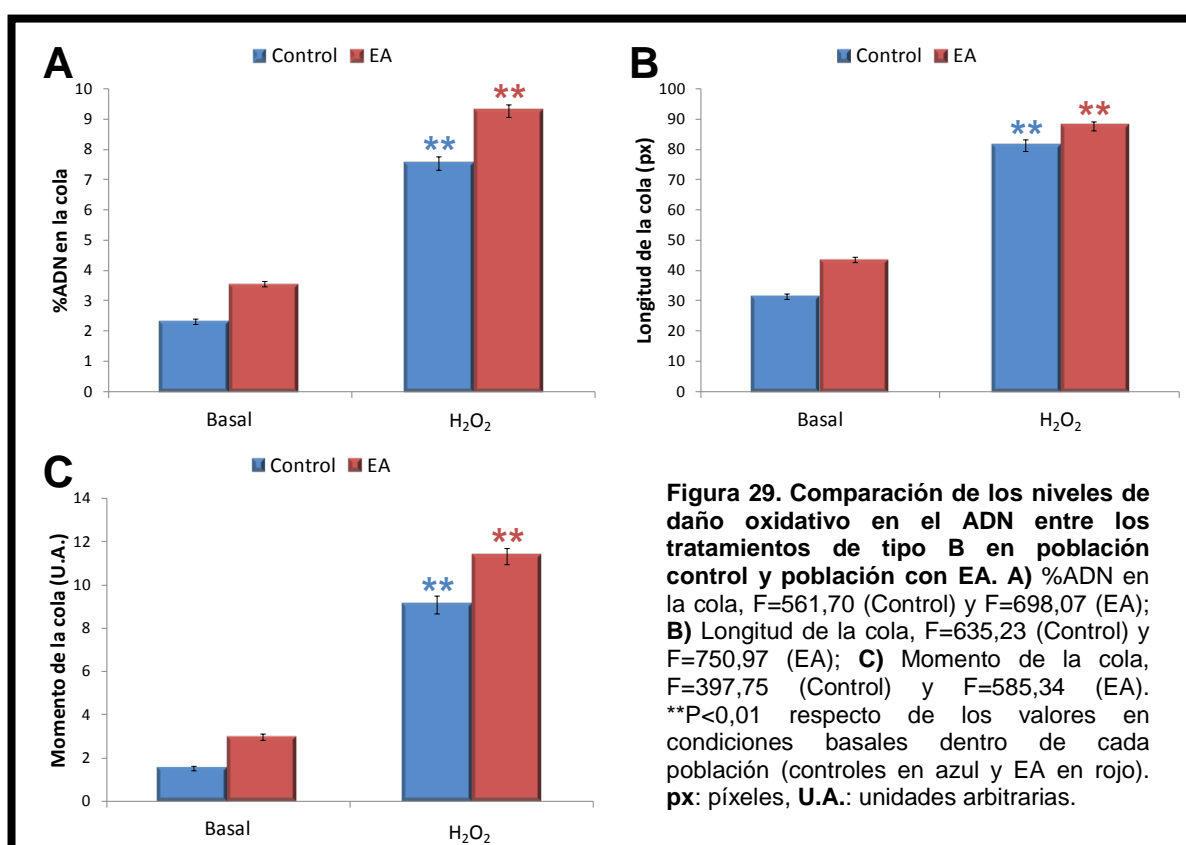


**Figura 28. Comparación del tanto por ciento de viabilidad celular determinada mediante el ensayo del MTT entre los diferentes tratamientos de tipo A en población control (azul) y población con EA (rojo).** AS: Agua sulfurada, AA: Ácido ascórbico.

### 3.2. EFECTOS DE AGENTES OXIDANTES EN CMSP DE EA (TRATAMIENTOS B)

Para poder definir el efecto protector del AS y los agentes antioxidantes de referencia (ver apartado 3.3. de Resultados) se decidió inducir un daño oxidativo exógeno a las CMSP de ambas poblaciones. Para ello se determinó el nivel de daño que generaba la adición de los agentes oxidantes (sin adición de antioxidantes) a las CMSP.

El análisis de los resultados de daño oxidativo al ADN confirmó que los datos seguían una distribución normal de los valores de las tres variables estudiadas ('%ADN', 'Longitud' y 'Momento') en ambas poblaciones (EA: %ADN-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Z=0,53; Longitud-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Z=0,32; Momento-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Z=0,61; Control: %ADN-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Z=0,86; Longitud-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Z=0,77; Momento-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Z=1,03. Todos P>0,05). La comparación entre los tratamientos de inducción de daño y la condición basal de las CMSP indicó, como era de esperar, que la inducción de daño con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumenta los valores de las tres variables de manera significativa en ambas poblaciones (Figura 29).



En cuanto a la viabilidad celular mediante MTT, a pesar de que se puede observar una clara disminución tras realizar los tratamientos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y HCY, no se

observaron diferencias significativas de ningún tratamiento respecto de las condiciones basales ( $\chi^2 = 3,48$  para población control  $\chi^2 = 5,02$  para población con EA;  $P > 0,05$ ) (Figura 30).

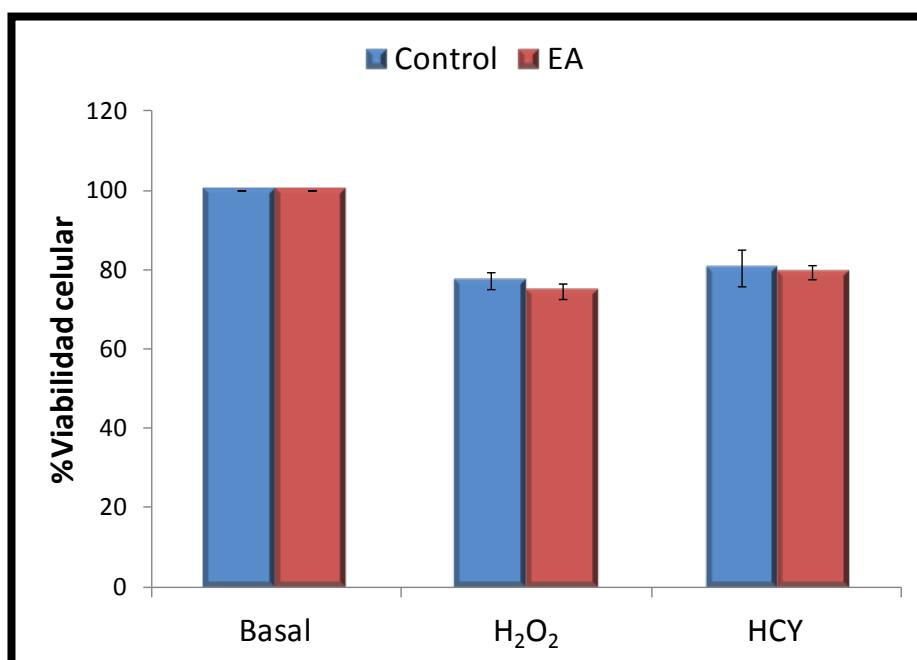


Figura 30. Comparación del tanto por ciento de viabilidad celular determinada mediante el ensayo del MTT entre los diferentes tratamientos de tipo B en población control (azul) y población con EA (rojo).

### 3.3. EVALUACIÓN DE EFECTOS PROTECTORES DEL AS EN CMSP DE EA (TRATAMIENTOS C)

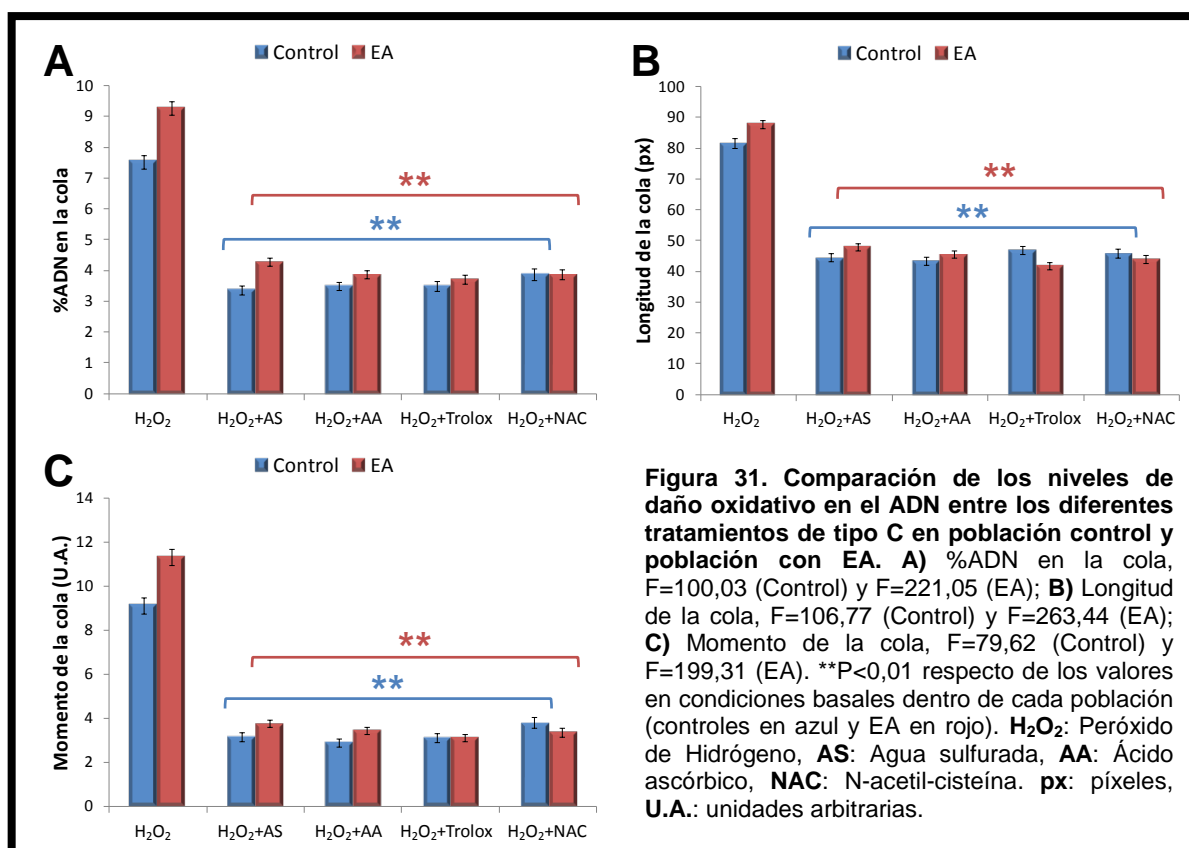
Finalmente, una vez determinado que los agentes antioxidantes no generaban *per se* daño al ADN de las CMSP ni disminuían su viabilidad, y que los agentes oxidantes sí generaban un aumento significativo de daño al ADN en CMSP en ambas poblaciones, se procedió a evaluar el posible efecto protector del AS tanto en la población con EA como en el grupo control. Respecto a la cuantificación de daño oxidativo al ADN, los valores de '%ADN', 'Longitud' y 'Momento' siguieron una distribución normal para el grupo de tratamientos C en ambas poblaciones (Tabla 15).

**Tabla 15. Análisis de distribución de los datos de daño oxidativo al ADN para los 4 tratamientos de tipo C en población con EA y población control.** Todos los análisis resultaron no significativos ( $P < 0,05$ ).  $H_2O_2$ : Peróxido de Hidrógeno, **AS**: Agua sulfurada, **AA**: Ácido ascórbico, **NAC**: N-acetil-cisteína.

	Variable	Tratamiento (valores de Z)			
		$H_2O_2$ +AS	$H_2O_2$ +AA	$H_2O_2$ +Trolox	$H_2O_2$ +NAC
EA	%ADN	0,83	0,90	0,82	0,72
	Longitud	0,68	0,63	0,69	0,41
	Momento	0,85	1,00	0,99	0,83
CONTROL	%ADN	1,25	0,98	1,09	0,86
	Longitud	1,00	0,59	0,71	0,74
	Momento	1,12	1,28	1,23	0,85

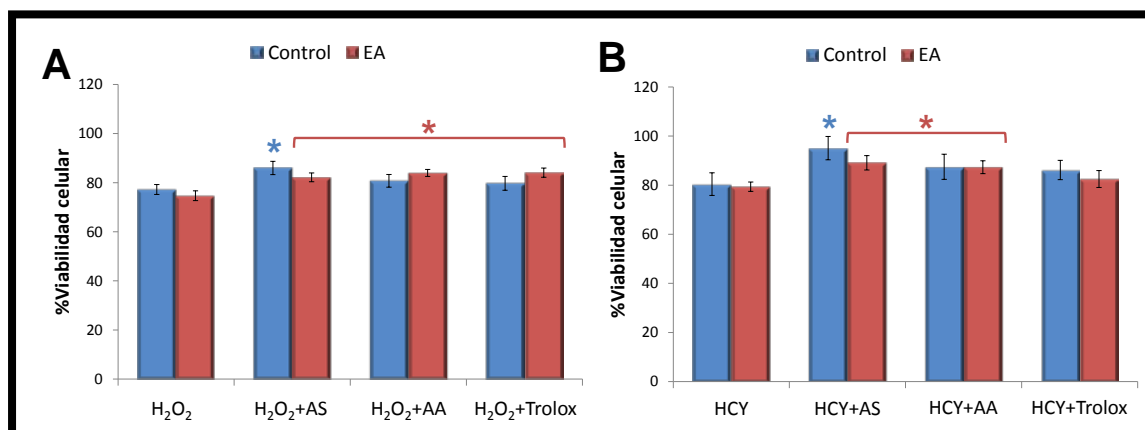
La comparación entre los tratamientos de inducción de daño (tratamientos B) y los tratamientos combinados de antioxidante y posterior inducción de daño oxidativo con  $H_2O_2$  (tratamientos C), indicaron que todos los tratamientos combinados disminuían significativamente el daño oxidativo observado respecto de aquellos donde se inducía el daño con  $H_2O_2$  (Figura 31). Estos resultados indican que la adición previa de los antioxidantes seleccionados (AS, AA, Trolox y NAC) puede prevenir la generación de daño en las CMSP inducido con  $H_2O_2$ . Además, en ambas poblaciones (pacientes con EA y grupo control) existían diferencias significativas entre alguno de los tratamientos utilizados (Tabla 16).

Por último, en cuanto a la viabilidad celular mediante MTT, para realizar la comparación entre diferentes tratamientos de tipo C se decidió analizar por separado los resultados en función del agente de inducción de daño utilizado. Por un lado, aquellos cuyo agente inductor fue el  $H_2O_2$  y por otro, aquellos cuyo daño fue inducido con HCY. En ambos casos se observaron diferencias significativas en la población control solamente para el tratamiento combinado con AS. Además, en el caso de la población con EA, también se encontraron diferencias para el tratamiento combinado con AA y Trolox cuando se utilizó  $H_2O_2$  como agente inductor. Sin embargo, al utilizar HCY, en la población con EA no existieron diferencias significativas cuando el tratamiento combinado contenía Trolox (Figura 32). Estos resultados sugieren que el AS podría proteger a las CMSP frente a un aumento de estrés oxidativo, no sólo en la muestra poblacional con EA, sino también en el grupo control, lo que indicaría un gran poder antioxidante de estas aguas.



**Tabla 16. Valores de daño oxidativo al ADN para los 4 tratamientos de tipo C en población con EA y población control.** %: porcentaje; **px**: píxeles; **U.A.**: unidades arbitrarias.  $H_2O_2$ : Peróxido de Hidrógeno, **AS**: Agua sulfurada, **AA**: Ácido ascórbico, **NAC**: N-acetil-cisteína. \* $P<0,05$ . Comparaciones entre tratamientos: **2**: AS vs. Trolox; **3**: AS vs. NAC; **4**: AA vs. Trolox; **5**: AA vs. NAC.

		Tratamiento			
Variable		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +AS	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +AA	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +Trolox	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +NAC
EA	%ADN (%)	4,28 ± 0,14	3,88 ± 0,13	3,80 ± 0,16	3,87 ± 0,16
	Longitud (px)	48,04 ± 1,14 <sup>*2,3</sup>	45,53 ± 1,16 <sup>*4</sup>	41,99 ± 1,13	44,05 ± 1,28
	Momento (U.A.)	3,76 ± 0,18	3,44 ± 0,16	3,29 ± 0,24	3,36 ± 0,20
CONTROL	%ADN (%)	3,37 ± 0,15 <sup>*3</sup>	3,49 ± 0,13	3,59 ± 0,18	3,96 ± 0,21
	Longitud (px)	44,38 ± 1,57	43,37 ± 1,43	47,05 ± 1,61	45,81 ± 1,65
	Momento (U.A.)	3,13 ± 0,23	2,87 ± 0,20 <sup>*5</sup>	3,31 ± 0,31	3,83 ± 0,29



**Figura 32. Comparación del tanto por ciento de viabilidad celular determinada mediante el ensayo del MTT entre los diferentes tratamientos de tipo C en población control (azul) y población con EA (rojo). A) Tratamientos con Peróxido de Hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como agente inductor de daño (Control:  $\chi^2= 5,78$ ; EA:  $\chi^2=12,90$ ). B) Tratamientos con Homocisteína (HCY) como agente inductor de daño (Control:  $\chi^2= 4,61$ ; EA:  $\chi^2=8,50$ ). \*P<0,05 respecto del tratamiento de inducción de daño. AS: Agua sulfurada; AA: Ácido ascórbico.**





## **V. DISCUSIÓN**



En la presente Tesis Doctoral se han abordado las posibles consecuencias derivadas del envejecimiento poblacional, cada vez más acusado en nuestra sociedad, en dos poblaciones con trastornos que cursan con patologías del sistema nervioso (deficiencia mental y demencia) de la Comunidad de Madrid. Se seleccionaron el síndrome de Down (SD) y la enfermedad de Alzheimer (EA) por su estrecha relación en edades avanzadas, pues en un alto porcentaje las personas con SD acaban desarrollando EA (Van Dyke *et al.*, 1998). En el caso del SD, el trabajo está orientado hacia conseguir más información sobre el estado de la función renal de estas personas, pues los estudios realizados hasta la fecha no revelan suficientes datos que puedan determinar lo que ocurre en esta función a edades avanzadas en personas con este síndrome. Por otro lado, en el caso de la población con EA, el objetivo principal fue determinar los niveles de estrés oxidativo en plasma y células sanguíneas, con el fin de testar posteriormente los efectos antioxidantes del agua AS y tratar de abrir nuevas vías terapéuticas que pudieran permitir una mejora de la calidad de vida de personas con EA.

## 1. EFECTOS GENERALES DEL ENVEJECIMIENTO POBLACIONAL EN SD Y EA

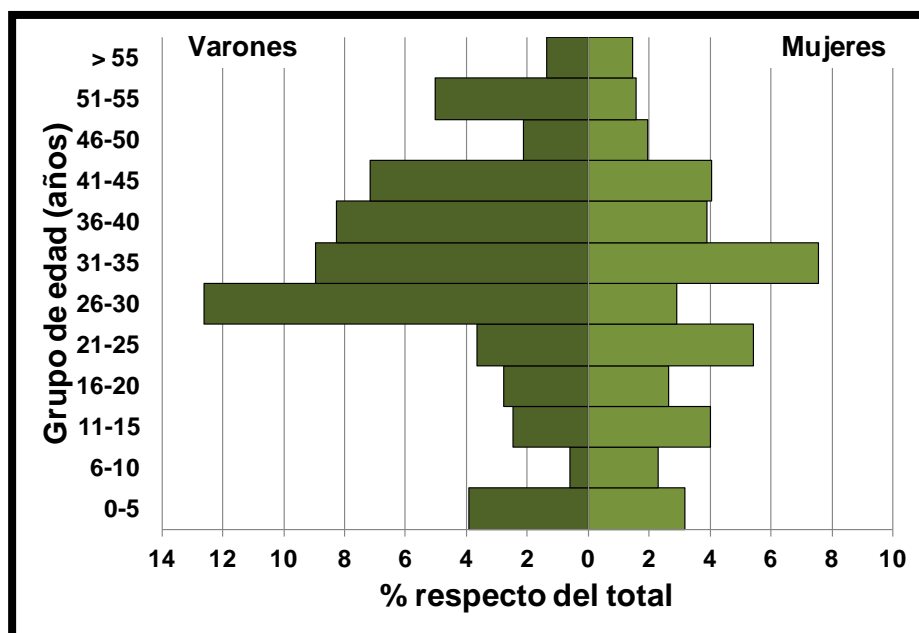
Como se ha comentado en la Introducción, es un hecho que la población mundial está envejeciendo (Kinsella *et al.*, 2005; Christensen *et al.*, 2009). Concretamente, España será uno de los países más envejecidos del mundo si los datos de mortalidad y las tasas de natalidad siguen con la tendencia actual (Otero *et al.*, 2004).

Según el Instituto Nacional de Estadística (INE), la esperanza de vida al nacer en nuestro país se sitúa en 81,87 años, siendo de 78,87 años para los varones y de 84,82 años para las mujeres.

Una de las consecuencias del envejecimiento que sufren las poblaciones es que dentro de éstas, grupos con discapacidades y una esperanza de vida menor que la población general hayan llegado a edades más elevadas que años atrás. Un claro ejemplo es el SD, que en poco más de medio siglo ha visto aumentada su esperanza de vida de 12 a más de 55 años (Bittles y Glasson, 2004; Barnhart y Connolly, 2007).

En España, según la *Encuesta de Discapacidad, Autonomía Personal y Situaciones de Dependencia* (EDAD) del año 2008 realizada por el INE, viven alrededor de 34000 personas con SD. De ellas, más del 13% supera los 45 años de edad, mientras que en el anterior censo (realizado en 1999) el porcentaje de ese grupo

poblacional no llegaba al 11%. Además, como se puede observar en la Figura 33, existe un predominio de varones sobre mujeres, sobre todo a partir de los 25 años de edad.



**Figura 33. Pirámide poblacional de SD en el año 2008.** Datos recopilados de la *Encuesta de Discapacidad, Autonomía Personal y Situaciones de Dependencia (EDAD)* realizada por el Instituto Nacional de Estadística. Un 1% en la gráfica representa unas 340 personas.

Este aumento en la esperanza de vida ubica a la población con SD en una situación nueva respecto a la de hace unas décadas, abriendo la puerta a la exposición de su organismo a posibles consecuencias derivadas de la edad avanzada, que antes no eran propias de personas con este síndrome. Por ello, es importante tratar de averiguar si los trastornos fisiológicos ya conocidos, como los problemas tiroideos (Korsager *et al.*, 1978) o las deficiencias en la vista (van Buggenhout *et al.*, 1999), entre otros, evolucionan negativamente o se mantienen estables. Y además, también cobra una gran relevancia la búsqueda y caracterización de nuevos problemas que antes no se manifestaran para aumentar el conocimiento del SD, sobre todo a edad avanzada, con objeto de poder desarrollar una monitorización y tratamientos adecuados en estas personas.

Adicionalmente, los datos poblacionales muestran una menor esperanza de vida en mujeres con SD en nuestro país, tal y como ocurre en poblaciones con SD del resto del mundo y justo al contrario que en la población mundial sin SD (Glasson *et al.*, 2003; Esbensen, 2010). Una posible causa de esta menor supervivencia en mujeres con SD podría ser la aparición temprana de la menopausia (Schupf *et al.*, 1997). Está

descrito que la menopausia es un factor de riesgo para padecer enfermedades cardíacas, depresión, osteoporosis o demencia en población general (Harlow y Ephross, 1995) y que en SD se asocia con pérdidas cognitivas y demencia (Patel *et al.*, 2001; Schupf *et al.*, 2003). Además, los problemas tiroideos, que son comunes en esta población, también podrían influir en la aparición temprana de la menopausia (Carr y Hollins, 1995), por lo que su diagnóstico, tratamiento y monitorización serían relevantes para la búsqueda de un aumento de la supervivencia en mujeres con SD.

Por otro lado, otra consecuencia directa del aumento en la esperanza de vida y el envejecimiento poblacional es el aumento de la incidencia de enfermedades asociadas al envejecimiento, como la EA. Actualmente existen en nuestro país alrededor de 600.000 personas con EA, y las predicciones, según la Sociedad Española de Neurología, son que para el año 2025 esta cifra se duplique. Las consecuencias inmediatas suponen que ha de seguirse una línea de actuación en pos de mejorar en la investigación diagnóstica, en el conocimiento de las causas de la enfermedad, en campañas de prevención y en los posibles tratamientos para paliar las consecuencias de la EA.

## **2. EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO POBLACIONAL SOBRE LA FUNCIÓN RENAL EN SD**

Los resultados referentes a la función renal en SD obtenidos en esta Tesis Doctoral muestran unos niveles de Cr urinaria en la población con SD significativamente menores que en la población control. Estas diferencias son debidas en su mayor parte a las encontradas en el rango de edad entre 16 y 60 años.

Debido a que la Cr es el producto final del metabolismo de la creatina, que se encuentra principalmente en la masa muscular, existe una buena correlación entre la masa magra de una persona y la eliminación de Cr (Forbes *et al.*, 1976; Remer *et al.*, 2002). Sin embargo, la masa magra no fue incluida en el diseño del presente estudio debido a que algunos trabajos no encontraron diferencias en este parámetro entre el grupo con SD y el grupo control, ni en niños ni en adultos (Allison *et al.*, 1995; Luke *et al.*, 1996).

También se puede suponer que una tasa metabólica reducida en personas con SD podría justificar esta disminución encontrada en los niveles urinarios de Cr. Una menor tasa metabólica conllevaría una menor actividad del ciclo de la creatina muscular (o lo que es lo mismo, una menor producción de Cr) y en consecuencia se

excretaría menos cantidad de metabolito por la orina. De hecho, la sarcopenia senil, término que se refiere a la progresiva pérdida de masa y fuerza muscular en personas mayores, ha sido descrita en personas de edad avanzada sin SD (Proctor *et al.*, 1998; Berger y Doherty, 2010; Musso y Oreopoulos, 2011) y también en personas con discapacidad intelectual sin especificar el tipo (Bastiaanse *et al.*, 2012). Podría ocurrir que este fenómeno se produjera antes en las personas con SD, pero existen resultados controvertidos al respecto (Allison *et al.*, 1998; Fernhall *et al.*, 2005).

Por otro lado, una de las características más importantes del SD es que estas personas muestran un elevado estrés oxidativo (Jovanovic *et al.*, 1998; Casado *et al.*, 2007; Campos *et al.*, 2010, 2011a; Lott, 2012). Este estrés oxidativo está íntimamente relacionado con el envejecimiento prematuro característico del SD (Odetti *et al.*, 1998; Druzhyňa *et al.*, 1998; Pallardó *et al.*, 2006; Zigman y Lott, 2007), que podría influir en una posible pérdida de función renal. De hecho, aunque el antioxidante más importante presente en los riñones, la ceruloplasmina, no parece que esté disminuido con la edad (Tórsdóttir *et al.*, 2001), la disminución en la excreción urinaria de Cr unida a la disminución en los valores de GE sugieren que pueda existir un daño en la función renal de las personas con SD, tal y como ha quedado demostrado en esta Tesis Doctoral.

## **2.1. INFLUENCIA DEL SEXO SOBRE MARCADORES DE FUNCIÓN RENAL EN SD**

El análisis de la influencia de factores socio-demográficos sobre las variables de función renal estudiadas en el SD (Cr y GE) determinó que los resultados varían en función del factor de comparación.

En relación al sexo de los individuos, en la población general, tanto los valores de Cr urinaria como de GE son mayores en los varones adultos respecto de los de las mujeres (Carrieri *et al.*, 2001; Barr *et al.*, 2005; Suwazono *et al.*, 2005). Esto es debido probablemente al mayor desarrollo muscular de los hombres (Alessio *et al.*, 1985; Barr *et al.*, 2005). En esta Tesis Doctoral, los valores observados siguen esa misma tendencia en ambas poblaciones (SD y grupo control), si bien las diferencias no son significativas entre varones y mujeres de la misma población. Además, tal y como cabe esperar, la comparación de los valores de Cr en dichas poblaciones entre personas del mismo sexo indica que las diferencias entre SD y grupo control se mantienen, lo que sugiere que las diferencias encontradas entre estas 2 poblaciones no responden a una predisposición en función del género de la persona. Por otra parte, aunque no existiesen diferencias significativas entre varones para la GE, cabe

pensar que ocurre lo mismo en esta variable que con la Cr. El valor de significación del test estadístico es muy próximo a 0,05 y por tanto es posible que tampoco influya el sexo en las diferencias encontradas entre la población con SD y la población control. De todas formas, para poder afirmar con mayor rotundidad estas aseveraciones, sería recomendable realizar estudios más profundos al respecto, donde se puedan utilizar a la vez otros métodos de detección complementarios.

## **2.2. INFLUENCIA DE LA EDAD SOBRE MARCADORES DE FUNCIÓN RENAL EN SD**

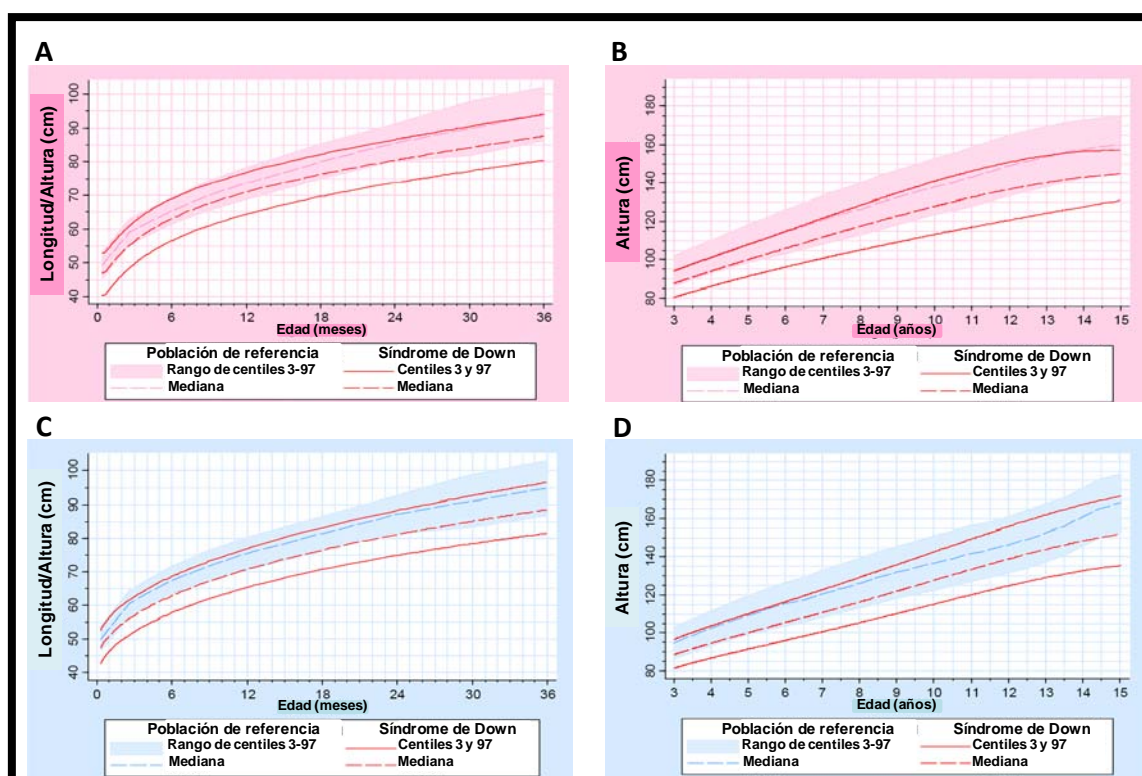
Las diferencias encontradas entre la muestra poblacional con SD y el grupo control son debidas en su mayor medida a las encontradas en los grupos de edad a partir de la pubertad (grupos de edad III, IV y V para la Cr y grupos de edad IV y V para la GE). Según los resultados de la presente Tesis Doctoral, es posible que el envejecimiento prematuro que caracteriza a las personas con SD afecte a la funcionalidad de su sistema renal, pues tanto los valores de Cr como los de GE son significativamente menores a partir de un rango de edad concreto. Está descrito que la tasa de filtración glomerular, la musculatura de los riñones y el número y tamaño de los glomérulos desciende con la edad (Alessio *et al.*, 1985; Nyengaard y Bendtsen, 1992). Sin embargo, aunque se ha observado que puede existir una reabsorción de Cr por parte de los túbulos renales en personas mayores sanas (Musso *et al.*, 2009), las diferencias encontradas tanto en los valores de Cr como los de GE (que incluye todos los metabolitos excretados en la orina) refuerzan la hipótesis de una función renal dañada en personas con SD de edad avanzada; a pesar de que según Málaga *et al.* (2005) la incidencia de fallos renales en este síndrome no difiera del resto de la población. Además, si la capacidad de dilución de la orina está disminuida en personas mayores (Musso y Oreopoulos, 2011) unos valores más bajos de Cr urinaria y GE en personas con SD significaría que estas personas tienen su orina más diluida de lo normal.

Respecto a las diferencias encontradas entre grupos de edad dentro de cada población (SD y grupo control), se puede afirmar que son diferencias ya observadas con anterioridad, pero con algunas variaciones. Está descrito desde hace años que la excreción urinaria de Cr a lo largo de la vida responde a un patrón de variación que presenta valores más bajos en la infancia y más elevados en jóvenes y adultos, influenciados en gran medida por un momento crítico en el crecimiento humano: la pubertad (Tanner, 1962). Observando los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, se podría inferir que es posible que exista un pequeño retraso en el



crecimiento de los niños con SD respecto al crecimiento de los niños de la población control, pues las diferencias significativas encontradas entre el grupo de edad I aparecen desplazadas hacia un grupo de edad mayor. Es decir, si en población control las diferencias se encuentran entre el grupo de edad I y los grupos II y III, en la población con SD estas diferencias son entre el grupo de edad I y los grupos III y IV.

El estudio comparativo las tablas de crecimiento descritas en la literatura (tabla de SD según Pastor *et al.*, 2004; tabla de población control según Sobradillo *et al.*, 2004) permite observar un pequeño retraso en el crecimiento, no sólo entre las poblaciones, sino también en las pendientes de las rectas de tendencia (Figura 34). Este hecho podría estar causado por una deficiencia en el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I), producido por la hormona del crecimiento (GH) (Annerén *et al.*, 1990), y ya se han realizado tratamientos con resultados positivos suplementando a los individuos con SD con diferentes dosis de GH (Annerén *et al.*, 1999; Annerén *et al.*, 2000; Pallotti *et al.*, 2002).



**Figura 34. Comparación de curvas de crecimiento en niños con SD y niños de una población control sin SD. A. Niñas hasta 3 años. B. Niñas hasta 15 años. C. Niños hasta 3 años. D. Niños hasta 15 años. Gráficas adaptadas de la Fundación Catalana de Síndrome de Down ([www.fcsd.org](http://www.fcsd.org)) basadas en los estudios de Pastor *et al.* (2004) y Sobradillo *et al.* (2004).**

El análisis de los resultados observados respecto del factor 'Edad' para la GE dentro de cada población indica claramente una disminución en los valores de este parámetro a medida que la edad avanza. Si bien las diferencias sólo son significativas en la población con SD, parece que con la edad la orina está más diluida. Además, dado que la disminución de valores de GE es más pronunciada en el SD, estos datos pueden indicar una pérdida de función renal también, fortaleciendo nuestra hipótesis de partida.

Para completar el análisis del factor 'Edad' se realizaron correlaciones bivariadas entre la Cr, la GE y la edad de los individuos en ambas poblaciones. Además, se realizó un análisis de regresión lineal en el caso de aquellas correlaciones que fueran significativas. Como se puede observar en los resultados de esta Tesis Doctoral (Figura 18), se encontraron correlaciones significativas entre Cr y GE y entre GE y la edad en las dos poblaciones (SD y grupo control). La correlación positiva encontrada entre Cr y GE era esperable e indica que estas dos variables sólo son capaces de explicar en parte el mismo fenómeno. Además, dado que sus coeficientes de correlación fueron muy parecidos en ambas poblaciones, es probable que los mecanismos que expliquen los valores de ambas variables sean los mismos o muy similares. Por otro lado, también se observó una relación lineal entre GE y la edad, que se podría corresponder con una capacidad disminuida para filtrar los metabolitos que se excretan por la orina a medida que la edad avanza. Estos datos son muy similares, tanto en la aproximación usando grupos de edad como en el ajuste por regresión usando los datos de edad en bruto, siendo en ambos casos la pendiente de la ecuación que se obtiene el doble en la población con SD respecto del grupo control (ver apartado 1.1. de Resultados. Figuras 18B y 19, respectivamente).

Por último, el hecho de que no se haya encontrado una correlación lineal entre Cr urinaria y edad, ni en las personas con SD ni en el grupo control, es algo esperable o normal. Esta afirmación está basada en la dependencia, ya mencionada, de la excreción de Cr con la masa muscular del individuo (Remer *et al.*, 2002). En los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral (ver apartado 1.1. de Resultados, Figura 18A), se puede percibir una tendencia similar en ambas poblaciones. Los valores de Cr van aumentando hasta alcanzar un máximo, que suele coincidir con la edad adulta, para después empezar a disminuir debido al envejecimiento. La etapa donde los valores crecen se corresponde con el desarrollo del individuo, con el consecuente aumento de masa muscular, mientras que en la etapa de descenso ocurre justo lo contrario, perdiéndose no sólo la musculatura (Davies *et al.*, 2002; Berger y Doherty, 2010) sino también parte de la función renal (Musso y Oreopoulos, 2011). En

definitiva, se puede afirmar que la evolución de los valores de Cr urinaria en el ciclo de vida de los seres humanos sigue una tendencia que se ajusta a una función de segundo grado. Además, también es representativo de la diferencia entre ambas poblaciones que ese ajuste sea matemáticamente peor en la población con SD (con un valor de  $R^2$  menor), lo que puede apoyar un ligero retraso en el crecimiento y sobre todo un envejecimiento prematuro que afecta a la función renal en estas personas.

### **2.3. INFLUENCIA DE LA DIETA SOBRE MARCADORES DE FUNCIÓN RENAL EN SD**

Además de la influencia de la edad y el sexo, se analizó la influencia de la dieta en los niveles de Cr y GE en ambas poblaciones, con especial atención a la ingesta de carne. La carne contiene creatina y trazas de Cr y está descrito que la creatina acumulada de la dieta puede desencadenar un gradual aumento en la excreción urinaria de Cr, incluso en personas con fallos renales (Hoberman *et al.*, 1948; Hoogwerf *et al.*, 1986; Lew y Bosch, 1991; Gutiérrez *et al.*, 1992; Davies *et al.*, 2002). Igualmente, cocinar la carne convierte la creatina a Cr (Jacobsen *et al.*, 1979), de modo que una dieta rica en carne puede contribuir al aumento de los niveles urinarios de Cr. Los resultados de esta Tesis Doctoral muestran unos niveles mayores de Cr urinaria y de GE en aquellas personas con mayor frecuencia de ingesta de carne. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas para ambos parámetros, entre una ingesta diaria de carne y una ingesta de sólo 2-3 veces por semana, tanto en población control como en la población con SD.

Recientemente, se han publicado estudios en los que se cuestiona el uso de la Cr como marcador de la ingesta de carne (Dragsted, 2010; Cross *et al.*, 2011). Estos estudios proponen otros marcadores con mayor independencia de otros factores (masa muscular, variabilidad intra-individual), como los niveles urinarios de 1-metil-histidina o 3-metil-histidina. Si bien es cierto que estos marcadores podrían ser más precisos a la hora de determinar la medida de ingesta de carne en la dieta, también cabe destacar que todavía no existen datos en la literatura que indiquen que también puedan utilizarse como indicadores de la función renal.

Por último, el resto de tipos de alimentos (fruta y verdura, lácteos y frutos secos) no influyeron en los parámetros de función renal analizados y no se encontraron diferencias significativas entre las dos frecuencias de ingesta descritas (diariamente o sólo 2 o 3 veces por semana). A pesar de que se ha observado que una ingesta elevada de carbohidratos podría aumentar la acumulación de creatina en el músculo esquelético (Green *et al.*, 1996), con el consecuente aumento en la

excreción urinaria de Cr, es posible que en el caso de la población con SD este factor no sea tan determinante, pues estas personas suelen tener una dieta bastante controlada, lo que justificaría el no haber encontrado diferencias en el resto de alimentos.

#### **2.4. INFLUENCIA DEL HIPOTIROIDISMO SOBRE MARCADORES DE FUNCIÓN RENAL EN SD**

Como se ha comentado anteriormente, el hipotiroidismo es la patología del tiroides que afecta con mayor frecuencia al SD (Fort *et al.*, 1984; Prasher, 1999; Mihçi, *et al.*, 2010). En la muestra poblacional analizada en esta Tesis Doctoral, el hipotiroidismo tenía una prevalencia del 30%. Estas personas estaban medicadas para hipotiroidismo con levotiroxina, de acuerdo con el cuestionario que cumplimentaron los participantes en este trabajo. La levotiroxina (o L-tiroxina) es una forma sintética de la tiroxina, que se receta a las personas con hipotiroidismo como reemplazo hormonal a la falta de síntesis propia del organismo. Por estos motivos se decidió analizar la influencia de la presencia de hipotiroidismo sobre las variables Cr y GE en la muestra poblacional con SD.

Está descrito que los niveles de Cr están influenciados por las hormonas tiroideas. De este modo, la presencia de hipotiroidismo aumenta los niveles séricos de Cr, debido principalmente a un menor aclaramiento de Cr, a una tasa de filtración glomerular disminuida y una mayor producción de Cr (Lafayette *et al.*, 1994; Kreisman y Hennessey, 1999; Petkov *et al.*, 2010).

Estudios previos realizados en personas sin SD mostraron que, tras tratamientos con hormonas tiroideas, la función renal mejoraba en gran medida, ya fuera mediante la valoración de la tasa de filtración glomerular (den Hollander *et al.*, 2005), la determinación del aclaramiento de Cr (Montenegro *et al.*, 1996), o los valores de Cr en suero (Kreisman y Hennessey, 1999; den Hollander *et al.*, 2005), e incluso todos los parámetros regresaban a sus valores de referencia.

Sin embargo, las personas con SD pertenecientes a la muestra poblacional analizada medicadas con levotiroxina para la disfunción tiroidea, seguían mostrando niveles de Cr urinaria menores que aquellos que no se medicaban. Las diferencias se encontraron en todos los grupos de edad, siendo significativas en el grupo III (de 16 a 25 años). Es posible que los factores que afectan a la excreción de Cr disminuida en el hipotiroidismo del SD pueden ser diferentes que los que afectan a población sin SD. Esto además podría explicar, al menos en parte, los niveles urinarios de Cr

disminuidos también en las personas con SD sin hipotiroidismo, comparadas con los de la población control.

Van Trotsenburg *et al.* (2005) observó elevadas concentraciones de TSH plasmática en casi todos los jóvenes con SD de su estudio, indicando que síntomas del hipotiroidismo son muchas veces atribuidos como características propias del SD. De hecho, algunas de las anormalidades descritas en SD están relacionadas con la función tiroidea:

- a) Niveles disminuidos de selenio (Nevé *et al.*, 1983), necesario para el correcto funcionamiento de las GPx selenio-dependientes plasmáticas, sintetizadas en los túbulos proximales del riñón (Avissar *et al.*, 1994) y que protegen los tirocitos de los peróxidos. Esta característica, además, también está presente en individuos con fallo renal crónico (Zachara *et al.*, 2006), lo que reforzaría la hipótesis propuesta de un posible fallo renal en personas con SD.
- b) Una deficiencia en la actividad de la fenilalanina hidroxilasa (Shaposhnikov *et al.*, 1979; Thiel y Fowkes, 2007), que transforma la fenilalanina en tirosina, aminoácido necesario para la síntesis de la hormona tiroidea. Se ha descrito que las personas con fallo renal crónico tienen problemas de hidroxilación de la fenilalanina y, en consecuencia, problemas en la síntesis de la tirosina (Kopple, 2007). Si en adición las personas con fallo renal crónico también sufren de estrés oxidativo elevado, es razonable pensar que en las personas con SD pueda estar sucediendo lo mismo.
- c) Una sobreexpresión del gen *DYRK1A*, que codifica la quinasa reguladora de la fosforilación de la tirosina de doble especificidad 1A (DYRK1A), situado en el cromosoma 21 (Dowjat *et al.*, 2007). La sobreproducción de DYRK1A puede reducir la disponibilidad de la tirosina, y por tanto puede producirse también menos hormona tiroidea. Recientemente, se ha descrito que la sobreproducción de DYRK1A puede influir en el proceso de neurodegeneración de las personas con SD, incluido el desarrollo de EA (Wegiel *et al.*, 2011). Sin embargo, aún no hay muchos estudios descritos respecto de su influencia en la función renal.

Por estos motivos, es probable que el tratamiento de la disfunción tiroidea en las personas con SD no normalice sus valores de Cr urinaria. Dado que, además, los valores de GE en personas con SD que tomaban levotiroxina también fueron menores (aunque no lo fueran significativamente) respecto de los que no estaban medicados,

es probable que pueda existir una disfunción renal causada por hipotiroidismo en SD. En cualquier caso, sería conveniente realizar estudios más profundos en este tema, utilizando además de los parámetros utilizados en esta Tesis Doctoral, determinaciones bioquímicas de otros marcadores de función renal, como la cistatina C, así como un completo seguimiento de otros parámetros que pudieran estar relacionados con ellos, como las enzimas o moléculas mencionadas en este apartado.

Por último, cabe destacar que si se sustraen las personas con SD que recibían tratamiento para hipotiroidismo de la comparación entre poblaciones (SD y grupo control), las diferencias encontradas siguen siendo significativas, al menos para la Cr, lo que estaría en concordancia con la citada hipótesis de fallo renal en personas mayores con SD.

En resumen, los resultados obtenidos en este apartado de la presente Tesis Doctoral revelan unos niveles de Cr urinarios disminuidos en la muestra poblacional con SD en el rango de edad entre 16 y 59 años. Asimismo, también se observan unos valores de GE más bajos para la población con SD en el rango de 26 a 59 años. Estos valores reducidos respecto de la población control pueden ser debidos al característico estrés oxidativo que presentan las personas con SD, normalmente más elevado que la población general, y que conduce a un envejecimiento prematuro que afectaría también a la función renal. De este modo, una función renal dañada demandaría más atención clínica para controlar cualquier otro problema asociado a ella.

Además, los reducidos niveles de Cr en personas con SD tratadas con levotiroxina sugieren que el hipotiroidismo puede afectar a la excreción urinaria de Cr en este síndrome, pues la medicación no parece que devuelva a estas personas los valores encontrados para SD sin tratar.

Para finalizar, otro aspecto no estudiado en esta Tesis Doctoral, pero que sí se ha discutido en trabajos previos de nuestro grupo (Campos *et al.*, 2011a; 2011b), es que esta disminución en los niveles urinarios de Cr podría influir en la comparación de biomarcadores urinarios en estudios en los que se compare el SD con una población control sin SD, dado que la Cr se usa generalmente para estandarizar los valores de otros parámetros urinarios. Por tanto, sería aconsejable que estas diferencias fueran tenidas en cuenta en futuros estudios basados en muestras de orina en SD, así como la realización de nuevos estudios que permitan confirmar la hipótesis propuesta de una posible función renal dañada en SD, utilizando otros biomarcadores, como la cistatina C y marcadores de daño tubular y glomerular, dado que no existen evidencias en la literatura actual.

### 3. ANÁLISIS DE BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN EA

Como se ha comentado en la Introducción, la presencia de estrés oxidativo está íntimamente ligada a la EA. De hecho, algunos autores la clasifican como causa temprana de la patogénesis de la enfermedad (Aluise *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2010). Sin embargo, las alteraciones producidas por la EA y otras enfermedades neurodegenerativas no sólo se observan en el sistema nervioso central. También existen manifestaciones y respuestas compensatorias sistémicas que afectan a un determinado número de tejidos periféricos. Estas últimas, aunque tienen menor relevancia clínica, permiten que sean tejidos potenciales de estudio para comprender los mecanismos y progresión de la EA, así como para comprobar la eficacia de posibles aproximaciones terapéuticas.

Las CMSP son un buen modelo de estudio, pues la sangre es un tejido fácilmente accesible, cuya recolección no genera excesivas molestias al paciente y del que se puede obtener un gran volumen de material (celular y no celular) para trabajar con él. De hecho, existen estudios en los que se han encontrado cambios específicos de la EA en leucocitos de sangre periférica que mimetizan con cambios en neuronas. Estos estudios incluyen alteraciones en la utilización de la glucosa (Urcelay *et al.*, 2001), aumento de sensibilidad ante estímulos apoptóticos (Eckert *et al.*, 1998), reentrada en ciclo celular (de las Cuevas *et al.*, 2003), señalización por calcio alterada (Bartolomé *et al.*, 2007) o aumento de la oxidación (Leutner *et al.*, 2005), entre otros.

En esta parte de la presente Tesis Doctoral se han determinado los niveles de estrés oxidativo y la capacidad antioxidante en tejido sanguíneo de una muestra poblacional con EA de la Comunidad de Madrid. Asimismo, los resultados obtenidos se han comparado con una población control (sin EA) de la misma área geográfica. Los biomarcadores elegidos para el estudio fueron el daño oxidativo al ADN en CMSP (mediante el ensayo del cometa), el daño oxidativo a proteínas (mediante la determinación de proteínas carboniladas y niveles de di-tirosina en plasma) y el daño por glicoxidación (mediante la determinación de AGEs en plasma). Además, se analizó la capacidad antioxidante del plasma mediante FRAP y la determinación de los niveles de grupos tiol (–SH).

#### 3.1. EVALUACIÓN DE DAÑO OXIDATIVO AL ADN EN CMSP

Una de las alteraciones que más contribuye al desarrollo de los mecanismos de patologías asociadas al envejecimiento es el daño al ADN (Lindahl, 1993). Así, no es de extrañar que más de 125 genes presentes en el genoma humano estén

relacionados con la reparación de esta molécula (Ronen y Glickman, 2001). Sin embargo, a veces estas defensas no son suficientes para paliar los ataques que recibe. Por ello, es importante contar con técnicas de determinación de daño al ADN con suficiente sensibilidad para ser detectado.

El ensayo del cometa es una técnica relativamente rápida y simple de utilizar que además es muy sensible a la hora de detectar daño en el ADN a nivel de células individuales (Singh *et al.*, 1988). En su versión alcalina, el daño que se detecta corresponde tanto a roturas de una hebra como de doble hebra del ADN. Además, esta versión también es capaz de detectar los entrecruzamientos, los sitios de escisión que no han sido reparados y los sitios lábiles al álcali. Por tanto, la versión alcalina del ensayo del cometa es capaz de detectar casi todo el daño presente en el ADN (Miyamae *et al.*, 1997), y por ello fue la versión elegida para ser utilizada en la presente Tesis Doctoral. Los parámetros utilizados, el %ADN en la cola del cometa, la longitud de la cola del cometa y el momento del cometa, son los parámetros más representativos de este daño y por ello fueron escogidos para cuantificar el daño presente en el ADN de las CMSP de las dos poblaciones.

Las personas con EA pertenecientes a la muestra poblacional analizada muestran mayor daño oxidativo en el ADN de sus CMSP respecto del observado en la población control, pues los niveles de los tres parámetros analizados son significativamente más elevados. El aumento del daño oxidativo en el ADN de personas con EA está descrito en diversos estudios, bien utilizando la propia técnica del cometa en CMSP (Mórocz *et al.*, 2002; Kadioglu *et al.*, 2004; Migliore *et al.*, 2005) o utilizando otros marcadores, como los niveles de 8-OHdG, tanto en CMSP, como en orina o líquido cefalorraquídeo (Mecocci *et al.*, 2002; Isobe *et al.*, 2010; Zengi *et al.*, 2011). Estos niveles de daño oxidativo en el ADN también se han observado en el tejido neuronal (Gabbita *et al.*, 1998) o incluso en otros tipos celulares de tejidos periféricos (Trippi *et al.*, 2001).

Los resultados de la presente Tesis Doctoral coinciden de esta manera con la literatura existente, si bien, dado que son observacionales, no se puede diferenciar si el estrés oxidativo observado es una causa o una consecuencia de la enfermedad.

Para profundizar un poco más en las diferencias encontradas entre ambas poblaciones, se analizó la posible influencia del género en el daño oxidativo al ADN de las poblaciones estudiadas (EA y control). Los resultados demostraron que no existen diferencias significativas entre géneros dentro de la misma población (ni en EA ni en población control), lo que indica que parece que no existe ningún factor asociado al



sexo del individuo que influya sobre el daño oxidativo que pueda recibir el ADN de sus CMSP.

En la literatura existe algún trabajo que indica que el estrés oxidativo al que están sometidos los varones es mayor que el de las mujeres, quizás debido a una mayor tasa metabólica (Loft *et al.*, 1992). Sin embargo, este estudio está realizado con otro biomarcador y en orina de 24h, por lo que no es comparable con los datos de esta Tesis Doctoral. Además, aunque está descrito que las mujeres producen más cantidad de antioxidantes a lo largo de su vida, gracias a los estrógenos (Borrás *et al.*, 2003; 2010), el hecho de que las integrantes femeninas de la muestra poblacional con EA estuvieran en edad menopáusica no aporta un argumento en contra de la no influencia del sexo en los resultados. Por tanto, podemos concluir que parece que el sexo de los participantes no influye en sus niveles de daño oxidativo al ADN, al menos en la muestra poblacional seleccionada.

Lo que sí se observa es que las diferencias encontradas entre las poblaciones EA y control parecen ser debidas a los varones, ya que entre las mujeres no se observan diferencias. Para intentar buscar una explicación a las diferencias del género, se realizó *a posteriori* un análisis de la edad de las 2 muestras poblacionales (EA y control) dividido según el sexo (Anexo I). No se observan diferencias significativas, ni en la edad de varones respecto de mujeres dentro de cada población, ni entre personas del mismo sexo comparando poblaciones, por lo que si existe algún tipo de sesgo no está relacionado con la edad. Teniendo en consideración estos datos, es posible que a la hora de comparar ambos sexos, el desequilibrio existente en el ratio varón/mujer de la muestra poblacional estudiada (17 mujeres y 8 varones en EA vs. 7 mujeres y 18 varones en la población control) esté influyendo en esta comparación, si bien sería conveniente analizar la influencia de este factor cuando las poblaciones estén equilibradas para evitar cualquier tipo de sesgo.

Por último, tampoco se observa una correlación entre los valores de daño oxidativo al ADN y la edad de los participantes en el estudio. Aunque se sabe que a medida que la edad aumenta el estrés oxidativo es mayor, puede que el rango de edad de las dos poblaciones, así como las distribuciones de edad de los participantes dentro de cada población, estén enmascarando una posible relación con la edad.

### 3.2. EVALUACIÓN DE DAÑO OXIDATIVO A PROTEÍNAS

La modificación oxidativa de proteínas es otro evento importante en el envejecimiento y en desórdenes neurodegenerativos como la EA (Butterfield *et al.*, 2001). La formación de grupos carbonilo en las proteínas es un marcador muy útil, ya que éstos pueden presentarse tras un ataque directo de los RL en alguna parte de la cadena aminoacídica, pueden surgir como productos de glicación y glicoxidación, o como productos de peroxidación lipídica tras reaccionar con proteínas (Butterfield *et al.*, 2001). Por otro lado, la di-tirosina se forma como resultado de un proceso post-traducciona l que afecta a proteínas de estructura específica. Dado que la dimerización de la tirosina puede estar afectada por RL como el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), la di-tirosina puede considerarse un buen marcador de proteínas modificadas tanto oxidativamente como nitrosativamente (Giulivi *et al.*, 2003). Adicionalmente, la di-tirosina también puede formar puentes de unión de proteínas diméricas expuestas a estrés oxidativo.

Aunque existe algún trabajo donde no se observan diferencias en los niveles de proteínas carboniladas entre personas con EA y personas sanas (Korolainen y Pirttilä, 2009; Aldred *et al.*, 2010; Sinem *et al.*, 2010), está bastante aceptado que uno de los ejemplos de estrés oxidativo elevado en esta patología son las concentraciones de este biomarcador. Se han observado concentraciones elevadas de proteínas carboniladas en cerebros de personas con EA (Hensley *et al.*, 1995; Lyras *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1998; Aksenov *et al.*, 2001), en células de tejidos periféricos (Cecchi *et al.*, 2002) y en plasma (Choi *et al.*, 2002; Polidori *et al.*, 2004; Zafrilla *et al.*, 2006; Bermejo *et al.*, 2008; Greilberger *et al.*, 2008, 2010; Puertas *et al.*, 2012).

En el caso de la di-tirosina, se ha observado que muchos dímeros del péptido A $\beta$  o de los agregados de la proteína Tau están unidos por un puente de di-tirosina tras la exposición a agentes oxidantes y la mediación de metales como el cobre (Atwood *et al.*, 2004; Reynolds *et al.*, 2005). Por ello, se han encontrado niveles elevados de este biomarcador en cerebros de personas de EA (Hensley *et al.*, 1998). Sin embargo, los niveles de di-tirosina en plasma sólo han sido determinados en un trabajo (Polidori *et al.*, 2004) por lo que los resultados de esta Tesis Doctoral aportan una nueva evidencia del aumento en los niveles de este biomarcador en tejidos periféricos. De este modo, los resultados de los dos biomarcadores elegidos para determinar el daño oxidativo a proteínas concuerdan con la bibliografía existente, pues indicaron que sus concentraciones eran significativamente más elevadas en la población con EA frente a la población control.

Por otro lado, también se intentó buscar una posible influencia del sexo y la edad sobre el estrés oxidativo a proteínas. Sin embargo, en ninguno de los dos parámetros analizados, proteínas carboniladas y di-tirosina, se encontraron diferencias entre géneros, tal y como describe Puertas *et al.* (2012) para las primeras. Asimismo, al realizar la comparación entre poblaciones dentro de personas del mismo sexo, se observó que para las proteínas carboniladas, los valores tanto de varones como de mujeres con EA eran mayores que los de la población control, pudiéndose inferir que las diferencias encontradas entre las dos poblaciones estaban debidas por igual a las encontradas entre ambos sexos. No obstante, cuando se realizó la misma comparación para los valores de di-tirosina, sólo fueron significativas las diferencias entre varones, indicando que las diferencias encontradas entre la población con EA y la población control se deben en mayor medida a los varones. Al igual que ocurre con el daño oxidativo al ADN, es posible que el desequilibrio existente en el número de varones y mujeres de ambas poblaciones pueda estar influyendo en cierta medida en los datos.

Finalmente, tampoco se observa una correlación significativa entre las dos variables y la edad, de manera que puede que de nuevo los mismos motivos argumentados para el daño oxidativo en el ADN estén ocurriendo en los biomarcadores de daño oxidativo a proteínas.

### **3.3. EVALUACIÓN DE DAÑO OXIDATIVO POR GLICOXIDACIÓN**

El daño oxidativo por glicoxidación también es muy importante en la EA. El cerebro es el órgano que más glucosa consume en el organismo y se ha observado que en cerebros de personas con EA el metabolismo de la glucosa está reducido (Blum-Degen *et al.*, 1995). Como consecuencia, existen problemas en la síntesis de neurotransmisores como acetil-colina o glutamato, o en la producción de energía en forma de ATP. Es por ello que cada vez está más aceptada la teoría de que padecer *Diabetes mellitus* puede ser un factor de riesgo para desarrollar EA (Ott *et al.*, 1999). Además, también existen evidencias de que la acumulación extracelular del péptido A $\beta$  o la deposición intracelular de la proteína Tau pueden estar mediadas por AGEs (Münch *et al.*, 1998; Loske *et al.*, 2000; Lüth *et al.*, 2005). Debido a los motivos expuestos, el análisis de los AGEs cobra una gran relevancia en esta patología, pues indica daño oxidativo tanto en glúcidos como en proteínas.

Sin embargo, no existen muchos estudios que determinen las concentraciones de AGEs en el plasma de personas con EA, y los que hay observan resultados contradictorios (Thome *et al.*, 1995; Riviere *et al.*, 1998). Los resultados de la presente

Tesis Doctoral muestran unos niveles de AGEs significativamente más elevados en la muestra poblacional con EA. Estos datos siguen en la línea argumental de la existencia de un elevado estrés oxidativo en EA, que no sólo ocurre en el cerebro de estas personas, sino también en tejidos periféricos. Además, los resultados obtenidos para los AGEs complementan al resto de parámetros analizados y aportan, una vez más, nueva información respecto de biomarcadores de estrés oxidativo sistémico en esta patología.

Respecto a la influencia del factor 'Sexo' en este biomarcador, se puede concluir que tampoco existe relación alguna, indicando de nuevo que tanto varones como mujeres sufren daño por glicoxidación en la misma medida. Sin embargo, al realizar la comparación entre ambas poblaciones (EA y control) dentro de personas del mismo sexo, las diferencias antes halladas desaparecían. La observación de los datos numéricos indica que es posible que los elevados EEM (error estándar de la media) obtenidos puedan estar influyendo en este aspecto. Para intentar mejorar estos datos, se podría modificar la muestra poblacional, evitando el ya mencionado desequilibrio entre sexos, o incluso utilizar técnicas de detección más precisas y sensibles, como la cromatografía de ultra resolución (Min *et al.*, 2012), aunque entonces habría que tener en cuenta el aumento de costes y la dificultad de manejo de los aparatos.

Por último, el análisis de la influencia del factor 'Edad' revela que tampoco existe una correlación significativa con los niveles de AGEs. De nuevo, es posible que el rango de edad de la muestra poblacional analizada pueda estar enmascarando posibles correlaciones entre niveles de AGEs y este factor, aunque con los datos obtenidos no se puede llegar a una conclusión definitiva.

### 3.4. EVALUACIÓN DE ESTATUS ANTIOXIDANTE

El estatus antioxidante de un individuo refleja la capacidad de defensa que tiene para hacer frente al ataque de los RL y las ROS/RNS. Puede determinarse de manera general, como por ejemplo mediante la capacidad antioxidante del plasma o la orina (Ghiselli *et al.*, 2000; Campos *et al.*, 2010), o mediante la detección de los niveles de antioxidantes específicos, enzimáticos o no enzimáticos. Este es el caso de la determinación de concentraciones de enzimas como SOD, CAT o GPx, o la cuantificación de niveles de vitaminas C y E, niveles de ácido úrico o concentración de GSH (Matés *et al.*, 1999; Polidori *et al.*, 2001; Campos *et al.*, 2010; Puertas *et al.*, 2012). Por norma general, en aquellas situaciones patológicas en las que interviene el estrés oxidativo, es habitual que el estatus antioxidante del individuo esté alterado, observándose una disminución de sus niveles de defensa antioxidante.

En las personas con EA está descrito que la capacidad antioxidante está significativamente disminuida respecto de la población sana (Pulido *et al.*, 2005; Calabrese *et al.*, 2006; Zafrilla *et al.*, 2006; Baldeiras *et al.*, 2008; Bermejo *et al.*, 2008; Puertas *et al.*, 2012). En la presente Tesis Doctoral se analizó la capacidad antioxidante del plasma, mediante su capacidad para reducir el ión férrico, así como los niveles de -SH, donde se determina el nivel de compuestos como GSH, el antioxidante no enzimático más potente del ser humano.

Los resultados obtenidos indican que tanto la capacidad antioxidante del plasma como los niveles de -SH están significativamente disminuidos en la muestra poblacional de personas con EA, tal y como cabe esperar según la bibliografía existente.

El análisis de los factores 'Sexo' y 'Edad' sobre los biomarcadores de estatus antioxidante indica que no existen diferencias significativas entre géneros dentro de cada población, al contrario que el estudio de Puertas *et al.* (2012), que determinó unos niveles de GSH menores en mujeres sanas respecto de varones. Por otro lado, se observan diferencias entre personas del mismo género comparando la población con EA respecto de la población control. Estos resultados indican que las diferencias encontradas en los niveles de defensa antioxidante no dependen del género, al menos en nuestra muestra poblacional. Además, tampoco existe una influencia de la edad en los resultados de estatus antioxidante, quizás debida al mencionado rango de edades de los integrantes del estudio.

En resumen, las determinaciones realizadas en esta parte de la presente Tesis Doctoral indican que, en la muestra poblacional analizada, las personas con EA tienen un estrés oxidativo sistémico significativamente mayor que el de una población sana de similar edad. El hecho de que se hayan observado diferencias tanto en los biomarcadores de daño oxidativo a ADN, proteínas y glúcidos, como en el estatus antioxidante, indica que el estrés oxidativo es una característica de la enfermedad muy importante, no sólo en el cerebro de estas personas, sino también en el resto de su organismo. Además, también se puede decir que el estrés oxidativo al que están sometidas las personas con EA no varía en función del sexo, ni tampoco existe una correlación del mismo con la edad. Sin embargo, debido a la mencionada limitación existente por el desequilibrio de las muestras poblacionales utilizadas, tanto en número de individuos por género como en rango de edades, no se puede concluir con certeza que estos factores no influyan en la EA, por lo que se recomienda un análisis más exhaustivo con muestras poblacionales equilibradas en cuanto a la edad.

#### 4. USO DEL AGUA SULFURADA COMO APROXIMACIÓN TERAPÉUTICA EN EA

Como ya se ha comentado, una de las posibles aplicaciones del uso de CMSP en estudios de la EA es la utilización de nuevos compuestos que puedan proteger a las células del aumento de estrés oxidativo (Collins, 2005). De este modo, aquellos que mostraran buenos resultados podrían ser utilizados como posibles terapias antioxidantes en la enfermedad.

En este apartado de la presente Tesis Doctoral se evaluó la posible utilización del AS como aproximación terapéutica en personas con EA. Para realizar esta evaluación se compararon los efectos del AS con los de otros antioxidantes reconocidos, como el AA, el trolox (análogo soluble de la vitamina E) y la NAC (Duthie *et al.*, 1996; Noroozi *et al.*, 1998; De la Fuente y Victor, 2001; Zachwieja *et al.*, 2005; Arranz *et al.*, 2007; Sudheer *et al.*, 2007), después de una inducción de estrés oxidativo adicional con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y HCY. Para valorar los efectos de los compuestos mencionados se utilizaron la técnica del cometa, ya utilizada para cuantificar el daño oxidativo al ADN, y una técnica de viabilidad celular, que mide la actividad mitocondrial de células metabólicamente activas (MTT).

El diseño experimental requirió de un análisis previo de los antioxidantes, para comprobar que no generaban estrés oxidativo *per se* sobre las células. La figura 26 (ver apartado 2.4 de Resultados) muestra los resultados de cada uno de los parámetros analizados en la técnica del cometa. Se puede observar que no sólo no existe un aumento de estrés oxidativo al añadir cada antioxidante a la solución celular, sino que disminuyen significativamente el nivel basal de los tres parámetros. El hecho de que los cuatro antioxidantes generen una disminución significativa en los parámetros de daño oxidativo al ADN puede estar causado por la edad de los participantes, pues dado que el envejecimiento del organismo está acompañado tanto de un aumento en el estrés oxidativo (Harman, 1956; Miquel *et al.*, 1980; von Zglinicki, 2002) como de una disminución de las defensas antioxidantes, o por la ineficacia o ineficiencia de las mismas (Samiec *et al.*, 1998; Mendoza-Núñez *et al.*, 2001; Dröge, 2002; Zorrilla, 2002), cualquier estímulo antioxidante adicional, por pequeño que sea, puede tener un efecto detectable, máxime utilizando una técnica tan sensible como el ensayo del cometa.

Además, las comparaciones entre tratamientos antioxidantes también muestran diferencias, sobre todo en la población control. Sin embargo, el propósito del trabajo no es analizar estas diferencias, sino las encontradas después de la inducción de daño, de manera que se pueda inferir un efecto inmediato del AS y los antioxidantes

de referencia tras la exposición de las CMSP a un aumento de estrés oxidativo. Por ello, la conclusión más importante de este apartado es que tanto el AS como el resto de antioxidantes utilizados no generan estrés oxidativo en las células, por lo que los resultados de los siguientes tratamientos no se verán enmascarados por éstos.

Por otro lado, los resultados del ensayo del MTT tampoco indican una disminución significativa en la viabilidad celular de las CMSP sometidas a estos tratamientos, lo que corrobora los resultados anteriores y confirma que ningún antioxidante utilizado, incluyendo al AS, genera un daño oxidativo a las mismas.

#### **4.1. LA ADICIÓN DE AGENTES OXIDANTES TIENE EFECTOS NEGATIVOS EN LAS CMSP DE PACIENTES CON EA**

A continuación, se pretendió generar un estrés oxidativo adicional a las CMSP utilizando como agentes oxidantes el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y la HCY. Aunque no es una especie muy reactiva *per se*, se sabe que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  tiene efectos tóxicos para las células desde 10  $\mu\text{M}$  hasta 100  $\mu\text{M}$ . Además, es capaz de atravesar la membrana plasmática y reaccionar con el hierro o el cobre, vía reacción de Fenton y Haber-Weiss, para formar especies más reactivas como el  $\text{OH}^\bullet$  en zonas más alejadas de su lugar de producción (Halliwell y Gutteridge, 2007). Por otro lado, los metales que quedan reducidos tras esta transformación pueden volver a oxidarse en presencia del  $\text{H}_2\text{O}_2$  que quede en el medio celular, produciendo  $\text{HO}_2^\bullet$ . Asimismo, se ha demostrado que la exposición de células a  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede incrementar la producción de  $\text{O}_2^{\bullet -}$  mediante la activación de la enzima NADPH oxidasa (Coyle *et al.*, 2006). El  $\text{H}_2\text{O}_2$  también es capaz de inactivar ciertas enzimas, normalmente por la oxidación de sus  $-\text{SH}$ , esenciales para la catálisis (Halliwell y Gutteridge, 2007) y tiene una elevada vida media (en comparación con otras ROS) y una alta estabilidad en medio fisiológico.

Por estos motivos, no es de extrañar que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  sea utilizado como agente oxidante estándar a la hora de evaluar las propiedades antioxidantes de diferentes compuestos, no sólo en CMSP, sino en cualquier tipo celular (Noroozi *et al.*, 1998; García *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2007; Soltani *et al.*, 2009; Behravan *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2011; Sreelatha y Padma, 2011), y por ello fue seleccionado para la presente Tesis Doctoral.

Como era de esperar, los niveles de daño oxidativo al ADN de las CMSP se vieron aumentados con la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tanto en la población con EA como en la población control, con valores de entre 1,5 y 4 veces superiores a los obtenidos en la condición basal. Aunque existen algunas diferencias en los métodos de cuantificación,

estos resultados concuerdan con la bibliografía existente en la que utilizan la misma concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100  $\mu\text{M}$ ) para inducir el daño oxidativo en CMSP humanas (Noroozi *et al.*, 1998; García *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2007; Behravan *et al.*, 2011). Además, cabe destacar que aunque los niveles de daño observados tras la inducción son mayores en población con EA, las diferencias respecto de la condición basal son muy similares, por lo que se puede inferir que las CMSP de ambas poblaciones responden de la misma manera al estímulo inductor de daño.

Por otro lado, el ensayo de viabilidad celular mediante la técnica del MTT no revela diferencias significativas en los tratamientos, a pesar de que el valor de P fue muy próximo a 0,05 (Figura 30, ver apartado 3.2. de Resultados). Sin embargo, dado que gráficamente se observa una tendencia a la baja de la viabilidad de las CMSP con la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y HCY, se realizó un análisis *a posteriori* en el que se compararon los datos de los tratamientos solamente con antioxidantes (Tratamientos A), que no difieren de la condición basal, con los tratamientos de inducción de daño (Tratamientos B). En el Anexo II de la presente Tesis Doctoral se observan los resultados del análisis, donde los valores de los tratamientos B son significativamente menores que los de los tratamientos A. De este modo, se puede concluir que, como cabe esperar, la viabilidad celular se ve disminuida con la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y HCY al medio.

Es importante destacar que los fundamentos de los dos ensayos de viabilidad usados en esta Tesis son diferentes. El método de exclusión de azul de tripano se basa en la capacidad de las células de introducir en su interior este reactivo, por lo que realmente se está reflejando la integridad de la membrana celular, por lo que los valores de viabilidad podrían estar subestimándose. Por otro lado, el ensayo de viabilidad mediante MTT se basa en una actividad metabólica, y por tanto sus resultados son más fiables en células metabólicamente activas, como las CMSP. Sin embargo, el ensayo no es tan rápido ni sencillo como la técnica de exclusión de azul de tripano, y por ello, es posible que los resultados de porcentaje de viabilidad puedan diferir un poco entre ambas técnicas.

Tras la puntualización realizada para los métodos de viabilidad celular, se puede concluir que el daño oxidativo al ADN generado por  $\text{H}_2\text{O}_2$  también disminuye la viabilidad de las CMSP. En el caso de la HCY, se ha descrito que ésta puede causar un aumento de daño oxidativo *in vitro*, mediante la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en reacciones de oxidación catalizadas por metales (via reacción de Fenton o haber-Weiss) y además, en presencia de óxido nítrico, puede ayudar a la formación de peroxinitrito, otro potente agente oxidante (Perna *et al.*, 2003). De hecho, aunque algún autor no



observa relación entre HCY y daño oxidativo en CMSP (Mangiagalli *et al.*, 2004), existen estudios en los que se prueba que una de las dianas principales del daño generado por HCY es el ADN, no sólo añadiendo HCY exógena a las células (Crott y Fenech, 2001; Picerno *et al.*, 2007), sino también en pacientes con hiperhomocisteinemia (Fenech *et al.*, 1997; Fenech, 1999; Bull *et al.*, 2009). Por tanto, los resultados de la presente Tesis Doctoral están en consonancia con la bibliografía existente, observándose nuevamente una respuesta muy similar en las CMSP de ambas poblaciones (EA y control). Finalmente, para poder confirmar que la disminución en la viabilidad celular tras el tratamiento con HCY se corresponde con un aumento en el daño oxidativo al ADN, sería interesante realizar en el futuro un estudio similar al realizado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, usando la técnica del cometa, de manera que se pudieran aportar nuevos datos del efecto oxidante de la HCY.

#### **4.2. EL AS PROTEGE FRENTE A INDUCCIÓN DE DAÑO OXIDATIVO EN CMSP EN PACIENTES DE EA**

Una vez comprobado que tanto el AS como los antioxidantes de referencia no generaban un daño oxidativo *per se*, y que los agentes oxidantes seleccionados (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y HCY) aumentaban el daño oxidativo y disminuían la viabilidad celular de manera significativa, se procedió a abordar el último objetivo, y más importante, de esta parte de la Tesis Doctoral, que fue la evaluación de las propiedades antioxidantes del AS tras una inducción exógena de daño oxidativo.

Como se ha comentado en la Introducción, las aguas minero-medicinales han sido usadas desde hace siglos como tratamientos terapéuticos frente a diversas dolencias (Moltó, 1992). En la actualidad, el avance de la ciencia está permitiendo descubrir qué características físico-químicas son las que confieren propiedades beneficiosas para el organismo a cada tipo de agua minero-medicinal. En el caso del AS, su uso está descrito en la bibliografía médica desde mediados del siglo XX, sobre todo para tratamientos de enfermedades del aparato respiratorio, mediante inhalaciones de los vapores de estas aguas (Mozota-Sagardia, 1960; Passa, 1964; Pisaneschi, 1979; Prévost *et al.*, 1983), y también existe algún trabajo donde la utilizan para tratar patologías del aparato digestivo (Ricci y Zacccone, 1975). En la actualidad, además de tratar enfermedades del tracto respiratorio (Ottaviano *et al.*, 2012), la investigación se ha extendido en busca de beneficios en otros sistemas del organismo, como el aparato cardiovascular (El-Seweidy *et al.*, 2011) o en diferentes patologías relacionadas con el estrés oxidativo (Ekmekcioglu *et al.*, 2002; Benedetti *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2009; Costantino *et al.*, 2012).

Los resultados de la presente Tesis Doctoral muestran por primera vez que el AS es capaz de disminuir los niveles de daño oxidativo en el ADN, así como evitar una pérdida de viabilidad celular, tras inducir daño oxidativo a las CMSP con  $\text{H}_2\text{O}_2$  y HCY. La característica más importante que define el AS es la presencia de  $\text{H}_2\text{S}$ , que le confiere unas propiedades antioxidantes que pueden ser muy útiles para la prevención y/o tratamiento de distintas patologías. El hecho de que el AS manifieste estos resultados se puede deber a dos características muy importantes que están implícitas por la presencia de  $\text{H}_2\text{S}$ . Por un lado, parte del  $\text{H}_2\text{S}$  presente en el AS añadida a la suspensión celular puede ser utilizado como “materia prima” para aumentar la síntesis de GSH (Kimura y Kimura, 2004; Braga *et al.*, 2008 y 2012; Benedetti *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2009; Predmore *et al.*, 2012), con lo que las defensas antioxidantes celulares tendrían una ayuda “extra” para combatir la posterior adición de los agentes oxidantes. Por otro lado, puede que quede algo de  $\text{H}_2\text{S}$  que no se haya utilizado para la síntesis de GSH, y por tanto podría reaccionar con RL y ROS que se vayan a producir por mediación del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o incluso reaccionar con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  directamente (Braga *et al.*, 2012), evitando que se produzcan RL y ROS más dañinas. De este modo, se podría decir que las propiedades antioxidantes del AS resultan de una doble función, de prevención y ataque, para combatir al daño oxidativo en las CMSP.

Además, la comparación de estos resultados con los obtenidos para los tres antioxidantes de referencia (AA, Trolox y NAC) indica que el efecto obtenido es muy similar en todos, al menos en cuanto a resultados de daño oxidativo a ADN, en ambas poblaciones (EA y control), por lo que se podría decir que el AS tiene unos efectos beneficiosos similares a los de estos tres antioxidantes. Sin embargo, el mecanismo de acción varía en función de la molécula. El AA actúa interceptando RL y ROS como  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{OH}^{\bullet}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y también puede ayudar a restaurar las propiedades antioxidantes de la vitamina E (Sies *et al.*, 1992). El Trolox es el análogo soluble de la vitamina E y mantiene todas las propiedades antioxidantes de ésta (Scott *et al.*, 1974; Cort *et al.*, 1975), cuya acción principal es la intercepción de RL como peroxilos y alcoxilos ( $\text{RO}_2^{\bullet}$  y  $\text{RO}^{\bullet}$  respectivamente, donde R es una cadena de hidrocarbonos). Por último, la NAC es el antioxidante de referencia utilizado cuyo mecanismo de acción es más parecido al del AS. Este hecho se debe a la presencia de un  $-\text{SH}$  en esta molécula, que al igual que el  $\text{H}_2\text{S}$ , puede actuar reaccionando con RL y ROS, y estimulando la síntesis de GSH en el organismo (Moldéus *et al.*, 1986; Aruoma *et al.*, 1989; Dekhuijzen, 2004).

De este modo, a los trabajos *in vitro* que demuestran la capacidad de reducir daño oxidativo a ADN por los tres antioxidantes de referencia (Duthie *et al.*, 1996; Noroozi *et al.*, 1998; De la Fuente y Victor, 2001; Zachwieja *et al.*, 2005; Arranz *et al.*,

2007; Sudheer *et al.*, 2007), habría que añadir la presente Tesis Doctoral, ya que es la primera vez que se describen efectos beneficiosos *in vitro* del AS sobre este biomarcador. Además, también es la primera vez que estos efectos son descritos en una población con EA, lo que permite que el AS pueda ser tenida en cuenta para futuras pruebas en modelos animales de la enfermedad y quizás en un futuro en pacientes con EA.

Respecto a los resultados de viabilidad celular, cabe destacar que los tratamientos con AS fueron los únicos que evitaron una disminución significativa de viabilidad usando ambos agentes oxidantes ( $H_2O_2$  y HCY) y en ambas poblaciones (EA y control) (ver apartado 3.3. de Resultados, Figura 32). Así, se podría decir que la adición de AS no sólo protege al ADN frente a daño oxidativo, sino que además su acción confiere a las CMSP cierta resistencia frente a una pérdida significativa de viabilidad.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para los tratamientos *in vitro* con AS en EA, el siguiente paso es preguntarse si estos efectos podrían extrapolarse a una futura terapia en pacientes con esta enfermedad, y para poder avanzar en este campo primero es necesario saber cuáles son los resultados que se obtienen con las terapias antioxidantes actuales.

El uso de las vitaminas C (AA) y E ( $\alpha$ -tocoferol) como terapias antioxidantes en EA ha sido utilizado en numerosos estudios. Sin embargo, los resultados obtenidos en todos ellos son bastante dispares. Mientras algunos indican que la suplementación de las vitaminas, bien por separado o en conjunto, pueden reducir daño neuronal, disminuir la progresión de la enfermedad e incluso aumentar la supervivencia de los pacientes, otros indican que no producen ningún efecto significativo (Arlt *et al.*, 2012; Boothby y Doering, 2005, revisado en Feng y Wang, 2012 y Harrison, 2012). De estos estudios se puede inferir que programar una terapia de suplementación con vitaminas para los pacientes de EA es más complicado, pues la implicación de otros factores, como por ejemplo el alelo del gen *APOE* que presenten, su ratio GSSH/GSH o la dieta que consuman va a influir en los resultados de la terapia.

Por estos motivos, una alternativa a la suplementación con antioxidantes es la suplementación con compuestos que aumenten las enzimas antioxidantes del propio organismo. La genisteína, por ejemplo, es un fitoestrógeno que aumenta la expresión de las enzimas antioxidantes y que podría utilizarse también en varones al no provocar los efectos secundarios que producen los estrógenos (Viña *et al.*, 2007). Adicionalmente, también se pueden utilizar suplementos que sean sustratos para la

producción de antioxidantes no enzimáticos, como el GSH. Como ya se ha comentado, el GSH es el antioxidante no enzimático más potente y con mayor prevalencia en el ser humano, y está descrito que su concentración está significativamente disminuida en la EA (Calabrese *et al.*, 2006). Además, esta disminución se correlaciona de manera significativa con una disminución en el estado cognitivo de los pacientes con EA (Lloret *et al.*, 2009) y es posible que ayude a que se desarrolle la enfermedad en estadios más tempranos o personas con deterioro cognitivo leve (Baldeiras *et al.*, 2008).

Dado que el factor limitante en la síntesis de GSH es la cisteína (Kimura y Kimura, 2004; Pocernich y Butterfield, 2012) se han investigado las propiedades de la NAC como terapia antioxidante en humanos, obteniendo prometedores resultados tras su administración, bien por separado (Adair *et al.*, 2001), o en un formato combinado con otros suplementos (Remington *et al.*, 2009). De esta manera, aumentar los niveles de GSH en el organismo es una estrategia terapéutica con un futuro prometedor, sobre todo si se utiliza en combinación con otros compuestos beneficiosos.

Pero los niveles de GSH no sólo se pueden aumentar mediante la suplementación con compuestos que contengan cisteína, como la NAC. Teóricamente, también es posible la adición de un precursor para la cisteína, que desemboque en la producción de GSH. Este precursor podría ser el H<sub>2</sub>S, el principal componente del AS y que le confiere sus propiedades antioxidantes. De este modo, según Predmore *et al.* (2012), la estimulación de la síntesis de GSH mediante H<sub>2</sub>S sería debida a diferentes factores, entre los que se incluyen: un aumento en la absorción de precursores del GSH (como glutamato o cisteína), un aumento en los niveles de la enzima productora de GSH (la enzima  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa), la estimulación de factores de transcripción que favorecen la síntesis y el transporte de GSH e incluso la disminución de la actividad de enzimas que catabolizan el GSH. Así, los resultados de la presente Tesis Doctoral indican que, *in vitro* y en la muestra poblacional utilizada, el AS podría ser considerada como una terapia antioxidante en la EA, basada en el aumento de los niveles de GSH celulares.

En definitiva, se puede concluir que los resultados obtenidos en esta parte de la presente Tesis Doctoral demuestran que, al menos *in vitro*, el AS puede proteger a las CMSP tanto de sufrir daño oxidativo en su ADN, como de perder viabilidad tras la inducción de estrés oxidativo exógeno. Estos resultados abren la puerta no sólo a una posible terapia de EA con este tipo de aguas, sino también a su posible uso como medida de prevención en población sin EA. De hecho, podría intentar utilizarse en

otras patologías relacionadas con estrés oxidativo elevado como SD, enfermedad de Parkinson o artritis reumatoide, o incluso en población sin este tipo de patologías pero expuesta a un mayor riesgo de desequilibrio en el estatus oxidativo de su organismo, como en fumadores o trabajadores expuestos a materiales o productos tóxicos de manera continuada. Además, otra de las ventajas de usar AS sería la posibilidad de elegir la posología del tratamiento (vía tópica u oral) en función de los objetivos finales del mismo, si bien sería conveniente realizar estudios previos al respecto para poder minimizar las limitaciones de sabor, olor y conservación que presenta el AS utilizada.

## **VI. CONCLUSIONES**



Las conclusiones de esta Tesis Doctoral se han dividido en función de las dos muestras poblacionales analizadas, atendiendo a los objetivos generales expuestos. De esta manera, respecto a la población con SD se puede concluir:

1. Los niveles urinarios de Cr y GE están significativamente disminuidos en SD respecto de población control.
2. El factor 'Sexo' no influye ni en la excreción urinaria de Cr ni en los valores de GE en las dos poblaciones analizadas (SD y control).
3. El análisis del factor 'Edad' indicó que existe un descenso en los niveles urinarios de Cr y GE en la población con SD respecto de la población control a partir de la etapa adulta, lo que podría indicar posibles problemas renales en individuos con SD a edades avanzadas, debidos principalmente al envejecimiento prematuro causado por estrés oxidativo.
4. La dieta, incluida la ingesta de carne, no influye en los valores urinarios de Cr y GE ni en la población con SD ni en la población control.
5. El hipotiroidismo, característico del SD, puede estar influyendo en la función renal de las personas con este síndrome, pues sus niveles urinarios de Cr son significativamente menores que los de aquellos que no lo padecen, aun siendo tratados con levotiroxina.
6. La sustracción de los individuos con hipotiroidismo de la población con SD no influye a la hora de la comparación entre SD y población control, lo que refuerza la hipótesis de una función renal dañada en este síndrome a edades avanzadas.

En cuanto a la población con EA, las conclusiones son:

7. Las CMSP de pacientes con EA tienen unos niveles de daño oxidativo al ADN mayores que los de la población control analizada.
8. Los biomarcadores de daño oxidativo a proteínas y daño por glicoxidación analizados en plasma también son significativamente mayores en pacientes con EA respecto de la población control.
9. La capacidad antioxidante del plasma, así como los niveles plasmáticos de grupos tiol están significativamente disminuidos en pacientes con EA respecto de población control.
10. El AS no produce efectos oxidantes en el ADN de CMSP ni disminuye su viabilidad, al igual que los antioxidantes de referencia utilizados (AA, Trolox y NAC).



11. Los tratamientos oxidantes con  $H_2O_2$  y HCY elevan el daño oxidativo al ADN de CMSP y disminuyen su viabilidad en las dos poblaciones analizadas.
12. El AS es capaz de evitar *in vitro* la generación de daño oxidativo al ADN tras inducción de daño con  $H_2O_2$  en CMSP tanto en pacientes con EA como en población control, así como una disminución en la viabilidad celular de CMSP tras inducción de daño con  $H_2O_2$  y HCY.
13. El efecto protector del AS podría ser debido a un aumento en la producción de GSH, así como a la capacidad del  $H_2S$  de interceptar RL y ROS, por lo que la disminución del daño oxidativo al ADN podría evitar una pérdida en la viabilidad de las CMSP, no sólo en EA, sino también en población control. De esta manera, los efectos del AS podrían ser beneficiosos también para otras poblaciones con patologías relacionadas con estrés oxidativo.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



- Abdul, H.M., Calabrese, V., Calvani, M., Butterfield, D.A. Acetyl-L-carnitine-induced up-regulation of heat shock proteins protects cortical neurons against amyloid-beta peptide 1-42-mediated oxidative stress and neurotoxicity: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci Res.* 2006; 84(2): 398-408.
- Adair, J.C., Knoefel, J.E., Morgan, N. Controlled trial of N-acetylcysteine for patients with probable Alzheimer's disease. *Neurology.* 2001; 57(8): 1515-1517.
- Aksenov, M.Y., Aksenova, M.V., Butterfield, D.A., Geddes, J.W., Markesbery, W.R. Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 2001; 103(2): 373-383.
- Aldred, S., Bennett, S., Mecocci, P. Increased low-density lipoprotein oxidation, but not total plasma protein oxidation, in Alzheimer's disease. *Clin Biochem.* 2010; 43(3): 267-271.
- Ahmed, S., Passos, J.F., Birket, M.J., Beckmann, T., Brings, S., Peters, H., Birch-Machin, M.A., von Zglinicki, T., *et al.* Telomerase does not counteract telomere shortening but protects mitochondrial function under oxidative stress. *J Cell Sci.* 2008; 121(Pt 7): 1046-1053.
- Alessio, L., Berlin, A., Dell'Orto, A., Toffoletto, F., Ghezzi, I. Reliability of urinary creatinine as a parameter used to adjust values of urinary biological indicators. *Int Arch Occup Environ Health.* 1985; 55: 99-106.
- Al-Hermi, B.E., Thorner, P.S., Arbus, G.S. Acute plasmacytic interstitial nephritis in a child with Down síndrome. *Pediatr Nephrol.* 1999; 13(4): 333-335.
- van Allen, M.I., Fung, J., Jurenka, S.B. Health care concerns and guidelines for adults with Down syndrome. *Am J Med Genet.* 1999; 89(2): 100-110.
- Allison, D.B., Gomez, J.E., Heshka, S., Babbitt, R.L., Geliebter, A., Kreibich, K., Heymsfield, S.B. Decreased resting metabolic rate among persons with Down Syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1995; 19(12): 858-61.
- Aluise, C.D., Robinson, R.A., Beckett, T.L., Murphy, M.P., Cai, J., Pierce, W.M., Markesbery, W.R., Butterfield, D.A. Preclinical Alzheimer disease: brain oxidative stress, Abeta peptide and proteomics. *Neurobiol Dis.* 2010; 39(2): 221-228.
- Alzheimer, A. Über eine eigenartige Erikrankung der Hirnrinde. *Allg. Z. Psychiatr.* 1907; 64: 146-148

- Anderson, M.E., Luo, J.L. Glutathione therapy: from prodrugs to genes. *Semin Liver Dis.* 1998; 18(4): 415-424.
- Annerén, G., Gustavson, K.H., Sara, V.R., Tuvemo, T. Growth retardation in Down syndrome in relation to insulin-like growth factors and growth hormone. *Am J Med Genet Suppl.* 1990; 7: 59-62.
- Annerén, G., Edman, B. Down syndrome--a gene dosage disease caused by trisomy of genes within a small segment of the long arm of chromosome 21, exemplified by the study of effects from the superoxide-dismutase type 1 (SOD-1) gene. *APMIS Suppl.* 1993; 40: 71-79.
- Annerén, G., Tuvemo, T., Carlsson-Skwirut, C., Lönnerholm, T., Bang, P., Sara, V.R., Gustafsson, J. Growth hormone treatment in young children with Down's syndrome: effects on growth and psychomotor development. *Arch Dis Child.* 1999; 80(4): 334-8.
- Annerén, G., Tuvemo, T., Gustafsson, J. Growth hormone therapy in young children with Down syndrome and a clinical comparison of Down and Prader-Willi syndromes. *Growth Horm IGF Res.* 2000; 10 Suppl B: S87-91.
- Arlt, S., Müller-Thomsen, T., Beisiegel, U., Kontush, A. Effect of one-year vitamin C- and E-supplementation on cerebrospinal fluid oxidation parameters and clinical course in Alzheimer's disease. *Neurochem Res.* 2012; 37(12): 2706-2714.
- Armijo M. Compendio de Hidrología Médica. Editorial Científico Médica. Madrid. 1968. 484pp.
- Arranz, N., Haza, A.I., García, A., Delgado, E., Rafter, J., Morales, P. Effects of organosulfurs, isothiocyanates and vitamin C towards hydrogen peroxide-induced oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized purines/pyrimidines) in human hepatoma cells. *Chem Biol Interact.* 2007; 169(1): 63-71.
- Aruoma, O.I., Halliwell, B., Hoey, B.M., Butler, J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med.* 1989; 6(6): 593-597.
- Atwood, C.S., Perry, G., Zeng, H., Kato, Y., Jones, W.D., Ling, K.Q., Huang, X., Moir, R.D., *et al.* Copper mediates dityrosine cross-linking of Alzheimer's amyloid-beta. *Biochemistry.* 2004; 43(2): 560-568.

- Avila, C., Parcet, M.A., Barros, A., Forn, C., Mallol, R., Gonzalez-Darder, J.M., Feliu-Tatay, R., Martinez-Lozano, M.D., *et al.* Memory evaluation using functional magnetic resonance: applications in preoperative patients and in Alzheimer's disease. *Rev Neurol.* 2004; 38(3): 284-291.
- Avissar, N., Ornt, D.B., Yagil, Y., Horowitz, S., Watkins, R.H., Kerl, E.A., Takahashi, K., Palmer, I.S., *et al.* Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase. *Am J Physiol.* 1994; 266(2 Pt 1): C367-75.
- Babior, B.M. Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood.* 1984; 64(5): 959-966.
- Baldeiras, I., Santana, I., Proença, M.T., Garrucho, M.H., Pascoal, R., Rodrigues, A., Duro, D., Oliveira, C.R. Peripheral oxidative damage in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2008; 15(1): 117-128.
- Barnhart, R.C., Connolly, B. Aging and Down syndrome: implications for physical therapy. *Phys Ther.* 2007; 87(10): 1399-1406.
- Barr, D.B., Wilder, L.C., Caudill, S.P., González, A.J., Needham, L.L., Pikle, J.L. Urinary creatinine concentrations in the U.S. population: Implications for urinary biologic monitoring measurements. *Environ Health Perspect.* 2005; 113(2): 192-200
- Barthel, H., Gertz, H.J., Dresel, S., Peters, O., Bartenstein, P., Buerger, K., Hiemeyer, F., Wittermer-Rump, S.M., *et al.* Cerebral amyloid- $\beta$  PET with florbetaben (18F) in patients with Alzheimer's disease and healthy controls: a multicentre phase 2 diagnostic study. *Lancet Neurol.* 2011a; 10(5): 424-435.
- Barthel, H., Luthardt, J., Becker, G., Patt, M., Hammerstein, E., Hartwig, K., Eggers, B., Sattler, B., *et al.* Individualized quantification of brain  $\beta$ -amyloid burden: results of a proof of mechanism phase 0 florbetaben PET trial in patients with Alzheimer's disease and healthy controls. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2011b; 38(9): 1702-1714.
- Barthel, H., Sabri, O. Florbetaben to trace amyloid- $\beta$  in the Alzheimer brain by means of PET. *J Alzheimers Dis.* 2011; 26 Suppl 3: 117-121.
- Bartolomé, F., de Las Cuevas, N., Muñoz, U., Bermejo, F., Martín-Requero, A. Impaired apoptosis in lymphoblasts from Alzheimer's disease patients: cross-

- talk of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin and ERK1/2 signaling pathways. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64(11): 1437-1448.
- Bastiaanse, L.P., Hilgenkamp, T.I., Ehteld, M.A., Evenhuis, H.M. Prevalence and associated factors of sarcopenia in older adults with intellectual disabilities. *Res Dev Disabil.* 2012; 33(6): 2004-2012.
- Bateman, R.J., Xiong, C., Benzinger, T.L., Fagan, A.M., Goate, A., Fox, N.C., Marcus, D.S., Cairns, N.J., *et al.* Clinical and Biomarker Changes in Dominantly Inherited Alzheimer's Disease. *N Engl J Med.* 2012; 367(9): 795-804.
- Beal, M.F. Less stress, longer life. *Nat Med.* 2005; 11(6): 598-599.
- Begni, B., Brighina, L., Sirtori, E., Fumagalli, L., Andreoni, S., Beretta, S., Oster, T., Malaplate-Armand, C., *et al.* Oxidative stress impairs glutamate uptake in fibroblasts from patients with Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37(6): 892-901.
- Behl, C., Davis, J., Cole, G.M., Schubert, D. Vitamin E protects nerve cells from amyloid beta protein toxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; 186(2): 944-950.
- Behl, C., Moosmann, B. Oxidative nerve cell death in Alzheimer's disease and stroke: antioxidants as neuroprotective compounds. *Biol Chem.* 2002; 383(3-4): 521-536.
- Behravan, J., Mosafa, F., Soudmand, N., Taghiabadi, E., Razavi, B.M., Karimi, G. Protective effects of aqueous and ethanolic extracts of *Portulaca oleracea* L. aerial parts on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage in lymphocytes by comet assay. *J Acupunct Meridian Stud.* 2011; 4(3): 193-197.
- Benedetti, S., Benvenuti, F., Nappi, G., Fortunati, N.A., Marino, L., Aureli, T., De Luca, S., Pagliarani, S., *et al.* Antioxidative effects of sulfurous mineral water: protection against lipid and protein oxidation. *Eur J Clin Nutr.* 2009; 63(1): 106-112.
- Bentahir, M., Nyabi, O., Verhamme, J., Tolia, A., Horr , K., Wiltfang, J., Esselmann, H., De Strooper, B. Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms. *J Neurochem.* 2006; 96(3): 732-742.
- Benzie, I.F., Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996; 239(1): 70-76.

- Berg, J.M., Crome, L., France, N.E. Congenital cardiac malformations in mongolism. *Br Heart J*. 1960; 22: 331-346.
- Berger, M.J., Doherty, T.J. Sarcopenia: prevalence, mechanisms, and functional consequences. *Interdiscip Top Gerontol*. 2010; 37: 94-114.
- Bermejo, P., Martín-Aragón, S., Benedí, J., Susín, C., Felici, E., Gil, P., Ribera, J.M., Villar, A.M. Peripheral levels of glutathione and protein oxidation as markers in the development of Alzheimer's disease from Mild Cognitive Impairment. *Free Radic Res*. 2008; 42(2): 162-170.
- Berthon, G. Does human beta A4 exert a protective function against oxidative stress in Alzheimer's disease? *Med Hypotheses*. 2000; 54: 672-677.
- Bittles, A.H., Glasson, E.J. Clinical, social, and ethical implications of changing life expectancy in Down syndrome. *Dev Med Child Neurol*. 2004; 46(4): 282-286.
- Bittles, A. H., Bower, C., Hussain, R., Glasson, E.J. The four ages of Down syndrome. *Eur J Public Health* 2007; 17: 221-225.
- Blackburn, E.H. Structure and function of telomeres. *Nature*. 1991; 350(6319): 569-573.
- Blum-Degen, D., Frölich, L., Hoyer, S., Riederer, P. Altered regulation of brain glucose metabolism as a cause of neurodegenerative disorders? *J Neural Transm Suppl*. 1995; 46: 139-147.
- Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., *et al*. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*. 1998; 279(5349): 349-352.
- Boeniger, M.F., Lowry, L.K., Rosenberg, J. Interpretation of urine results used to assess chemical exposure with emphasis on creatinina adjustments: A review. *Am Ind Hyg Assoc J* 1993; 54(10): 615-627.
- Bogart, M.H., Pandian, M.R., Jones, O.W. Abnormal maternal serum chorionic gonadotropin levels in pregnancies with fetal chromosome abnormalities. *Prenat Diagn*. 1987; 7(9): 623-630.
- Bonomini, F., Tengattini, S., Fabiano, A., Bianchi, R., Rezzani, R. Atherosclerosis and oxidative stress. *Histol Histopathol*. 2008; 23(3): 381-390.



- Boothby, L.A., Doering, P.L. Vitamin C and vitamin E for Alzheimer's disease. *Ann Pharmacother.* 2005; 39(12): 2073-2080.
- Borrás, C., Sastre, J., García-Sala, D., Lloret, A., Pallardó, F.V., Viña, J. Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic Biol Med.* 2003; 34(5): 546-552.
- Borrás, C., Gambini, J., López-Grueso, R., Pallardó, F.V., Viña, J. Direct antioxidant and protective effect of estradiol on isolated mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1802(1): 205-211.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-254.
- Braga, P.C., Sambataro, G., Dal Sasso, M., Culici, M., Alfieri, M., Nappi, G. Antioxidant effect of sulphurous thermal water on human neutrophil bursts: chemiluminescence evaluation. *Respiration.* 2008; 75(2): 193-201.
- Braga, P.C., Dal Sasso, M., Culici, M., Falchi, M., Spallino, A., Nappi, G. Free radical-scavenging activity of sulfurous water investigated by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. *Exp Lung Res.* 2012; 38(2): 67-74.
- Brenna, J.T., Diau, G.Y. The influence of dietary docosahexaenoic acid and arachidonic acid on central nervous system polyunsaturated fatty acid composition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2007; 77(5-6): 247-250.
- Brent, G.A. The molecular basis of thyroid hormone action. *N Engl J Med.* 1994; 331(13): 847-853.
- Brewer, G.J. Why vitamin E therapy fails for treatment of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2010; 19(1): 27-30.
- van Buggenhout, G.J., Trommelen, J.C., Schoenmaker, A., De Bal, C., Verbeek, J.J., Smeets, D.F., Ropers, H.H., Devriendt, K., *et al.* Down syndrome in a population of elderly mentally retarded patients: genetic-diagnostic survey and implications for medical care. *Am J Med Genet.* 1999; 85(4): 376-384.
- Bull, C.F., O'Callaghan, N.J., Mayrhofer, G., Fenech, M.F. Telomere length in lymphocytes of older South Australian men may be inversely associated with plasma homocysteine. *Rejuvenation Res.* 2009; 12(5): 341-349.

- Burlinson, B., Tice, R.R., Speit, G., Agurell, E., Brendler-Schwaab, S.Y., Collins, A.R., Escobar, P., Honma, M., Kumaravel, T.S., Nakajima, M., Sasaki, Y.F., Thybaud, V., Uno, Y., Vasquez, M., Hartmann, A. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutat Res.* 2007; 627(1): 31-35.
- Bush, A., Beail, N. Risk factors for dementia in people with down syndrome: issues in assessment and diagnosis. *Am J Ment Retard.* 2004; 109(2): 83-97.
- Butterfield, D.A. Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radic Res.* 2002; 36(12): 1307-1313.
- Cadet, J., Douki, T., Ravanat, J.L. Oxidatively generated base damage to cellular DNA. *Free Radic Biol Med.* 2010; 49(1): 9-21.
- Calabrese, V., Sultana, R., Scapagnini, G., Guagliano, E., Sapienza, M., Bella, R., Kanski, J., Pennisi, G., *et al.* Nitrosative stress, cellular stress response, and thiol homeostasis in patients with Alzheimer's disease. *Antioxid Redox Signal.* 2006; 8(11-12): 1975-1986.
- Calissano, P., Matrone, C., Amadoro, G. Apoptosis and in vitro Alzheimer disease neuronal models. *Commun Integr Biol.* 2009; 2(2): 163-169.
- Campos, C., Guzmán, R., López-Fernández, E., Casado, A. Urinary uric acid and antioxidant capacity in children and adults with Down syndrome. *Clin Biochem.* 2010; 43(3): 228-233.
- Campos, C., Guzmán, R., López-Fernández, E., Casado, A. Evaluation of urinary biomarkers of oxidative/nitrosative stress in adolescents and adults with Down syndrome. *Biochim Biophys Acta.* 2011a; 1812(7): 760-768.
- Campos, C., Guzmán, R., López-Fernández, E., Casado, A. Evaluation of urinary biomarkers of oxidative/nitrosative stress in children with Down syndrome. *Life Sci.* 2011b; 89(17-18): 655-661.
- Carr, J., Hollins, S. Menopause in women with learning disabilities. *J Intellect Disabil Res.* 1995; 39 (Pt 2): 137-139.
- Carrieri, M., Trevisan, A., Bartolucci, G.B. Adjustment to concentration-dilution of spot urine samples: correlation between specific gravity and creatinine. *Int Arch Occup Environ Health.* 2001; 74(1): 63-67.

- Carrodeguas, J.A., Rodolosse, A., Garza, M.V., Sanz-Clemente, A., Pérez-Pé, R., Lacosta, A.M., Domínguez, L., Monleón, I., *et al.* The chick embryo appears as a natural model for research in beta-amyloid precursor protein processing. *Neuroscience*. 2005; 134(4): 1285-1300.
- Carta, A., Calvani, M., Bravi, D., Bhuachalla, S.N. Acetyl-L-carnitine and Alzheimer's disease: pharmacological considerations beyond the cholinergic sphere. *Ann N Y Acad Sci*. 1993; 695: 324-326.
- Casado, A., López-Fernández, M.E., Ruíz, R. Lipid peroxidation in Down syndrome caused by regular trisomy 21, trisomy 21 by Robertsonian translocation and mosaic trisomy 21. *Clin Chem Lab Med*. 2007; 45(1): 59-62.
- Casado, A., López-Fernández, M.E., Casado, M.C., de La Torre, R. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in vascular and Alzheimer dementias. *Neurochem Res*. 2008; 33(3): 450-458.
- Cecchi, C., Fiorillo, C., Sorbi, S., Latorraca, S., Nacmias, B., Bagnoli, S., Nassi, P., Liguri, G. Oxidative stress and reduced antioxidant defenses in peripheral cells from familial Alzheimer's patients. *Free Radic Biol Med*. 2002; 33(10): 1372-1379.
- Chauhan, N.B. Effect of aged garlic extract on APP processing and tau phosphorylation in Alzheimer's transgenic model Tg2576. *J Ethnopharmacol*. 2006; 108(3): 385-394.
- Chicoine, B., McGuire, D. Longevity of a woman with Down syndrome: a case study. *Ment Retard*. 1997; 35(6): 477-479.
- Choi, J., Malakowsky, C.A., Talent, J.M., Conrad, C.C., Gracy, R.W. Identification of oxidized plasma proteins in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 293(5): 1566-1570.
- Christen, Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr*. 2000; 71(2): 621S-629S.
- Christensen, K., Doblhammer, G., Rau, R., Vaupel, JW. Ageing populations: the challenges ahead. *Lancet*. 2009; 374: 1196–1208.
- Chui, H.C., Tierney, M., Zarow, C., Lewis, A., Sobel, E., Perlmuter, L.S. Neuropathologic diagnosis of Alzheimer disease: interrater reliability in the

- assessment of senile plaques and neurofibrillary tangles. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 1993; 7: 48-54.
- Ciccocioppo, F., Lanuti, P., Marchisio, M., Gambi, F., Santavenere, E., Pierdomenico, L., Bascelli, A., Velluto, L., *et al.* Expression and phosphorylation of protein kinase C isoforms in Abeta(1-42) activated T lymphocytes from Alzheimers disease. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2008; 21(1): 23-33.
- Cole, G.M., Teter, B., Frautschy, S.A. Neuroprotective effects of curcumin. *Adv Exp Med Biol.* 2007; 595: 197-212.
- Collins, A.R., Duthie, S.J., Dobson, V.L. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis.* 1993; 14(9): 1733-1735.
- Collins, A.R. Assays for oxidative stress and antioxidant status: applications to research into the biological effectiveness of polyphenols. *Am J Clin Nutr.* 2005; 81(1 Suppl): 261S-267S.
- Coppus, A.M., Evenhuis, H.M., Verberne, G.J., Visser, F.E., Eikelenboom, P., van Gool, W.A., Janssens, A.C., van Duijn, C.M. Early age at menopause is associated with increased risk of dementia and mortality in women with Down syndrome. *J Alzheimers Dis.* 2010; 19: 545–550.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., *et al.* Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science.* 1993; 261(5123): 921-923.
- Cort, W.M., Scott, J.W., Araujo, M., Mergens, W.J., Cannalunga, M.A., Osadca, M., Harley, H., Parrish, D.R., Pool, W.R. Antioxidant activity and stability of 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid. *J Am Oil Chem Soc.* 1975; 52(6): 174-178.
- Coyle, C.H., Martinez, L.J., Coleman, M.C., Spitz, D.R., Weintraub, N.L., Kader, K.N. Mechanisms of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 2006; 40(12): 2206-2213.
- Craig-Schapiro, R., Kuhn, M., Xiong, C., Pickering, E.H., Liu, J., Misko, T.P., Perrin, R.J., Bales, K.R., *et al.* Multiplexed immunoassay panel identifies novel CSF

- biomarkers for Alzheimer's disease diagnosis and prognosis. PLoS One. 2011; 6(4): e18850.
- Crim, M.C. Creatine metabolism in men: creatine pool size and turnover in relation to creatine intake. J Nutr. 1976; 106: 307-381.
- Cross, A.J., Major, J.M., Sinha, R. Urinary biomarkers of meat consumption. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2011; 20(6): 1107-1111.
- Crott, J., Fenech, M. Preliminary study of the genotoxic potential of homocysteine in human lymphocytes in vitro. Mutagenesis. 2001; 16(3): 213-217.
- Cuckle, H.S., Wald, N.J., Lindenbaum, R.H. Maternal serum alpha-fetoprotein measurement: a screening test for Down syndrome. Lancet. 1984; 1(8383): 926-929.
- Cuckle, H.S., Wald, N.J., Thompson, S.G. Estimating a woman's risk of having a pregnancy associated with Down's syndrome using her age and serum alpha-fetoprotein level. Br J Obstet Gynaecol. 1987; 94: 387-402.
- Cuenca-Giralde E. Influencia de la crenoterapia con aguas bicarbonatadas sulfatadas en el estrés oxidativo de una población balnearia. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Madrid: UCM; 2003.
- de las Cuevas, N., Urcelay, E., Hermida, O.G., Saíz-Díaz, R.A., Bermejo, F., Ayuso, M.S., Martín-Requero, A. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent modulation of cell cycle elements pRb and p27kip1 involved in the enhanced proliferation of lymphoblasts from patients with Alzheimer dementia. Neurobiol Dis. 2003; 13(3): 254-263.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., Milzani, A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. Clin Chem. 2006; 52(4): 601-623.
- Dahse, R., Fiedler, W., Ernst, G. Telomeres and telomerase: biological and clinical importance. Clin Chem. 1997; 43(5): 708-714.
- Davies, K.M., Heaney, R.P., Rafferty, K. Decline in muscle mass with age in women: a longitudinal study using an indirect measure. Metabolism. 2002; 51(7): 935-939.
- Dekhuijzen, P.N. Antioxidant properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir J. 2004; 23(4): 629-36.

- Denizot, F., Lang, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*. 1986; 89(2): 271-277.
- Dizdaroglu, M. Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases. *Mutat Res*. 2005; 591(1-2): 45-59.
- Dowjat, W.K., Adayev, T., Kuchna, I., Nowicki, K., Palminiello, S., Hwang, Y.W., Wegiel, J. Trisomy-driven overexpression of DYRK1A kinase in the brain of subjects with Down syndrome. *Neurosci Lett*. 2007; 413(1): 77-81.
- Down, J.L.H. Observations on an ethnic classification of idiots. *Clinical Lecture Reports, London Hospital*. 1866; 3: 259-262.
- Dragsted, L.O. Biomarkers of meat intake and the application of nutrigenomics. *Meat Sci*. 2010; 84(2): 301-307.
- Dröge, W. Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants. *Exp Gerontol*. 2002; 37(12): 1333-1345.
- Druzhyna, N., Nair, R.G., LeDoux, S.P., Wilson, G.L. Defective repair of oxidative damage in mitochondrial DNA in Down's syndrome. *Mutat Res*. 1998; 409(2): 81-89.
- Duff, K., Suleman, F. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease: how useful have they been for therapeutic development? *Brief Funct Genomic Proteomic*. 2004; 3(1): 47-59.
- Dušinská, M., Collins, A. Detection of oxidised purines and UV-induced photoproducts in DNA of single cells, by inclusion of lesion-specific enzymes in the comet assay. *Altern. Lab. Anim*. 1996; 24: 405-411.
- Duthie, S.J., Ma, A., Ross, M.A., Collins, A.R. Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Res*. 1996; 56(6): 1291-1295.
- van Dyke, D.C., Harper, D.C., Dyken, E. Alzheimer's disease and Down syndrome. *Down Syndrome Quart*. 1998; 3(3): 1-11.
- Ebert, A.K., Brookman-Amisshah, S., Rösch, W.H. Urological manifestations of Down syndrome: significance and long-term complications -- our own patient cohort with an overview. *Urologe A*. 2008; 47(3): 337-341.

- Eckert, A., Hartmann, H., Förstl, H., Müller, W.E. Alterations of intracellular calcium regulation during aging and Alzheimer's disease in nonneuronal cells. *Life Sci.* 1994; 55(25-26): 2019-2029.
- Eckert, A., Cotman, C.W., Zerfass, R., Hennerici, M., Müller, W.E. Lymphocytes as cell model to study apoptosis in Alzheimer's disease: vulnerability to programmed cell death appears to be altered. *J Neural Transm Suppl.* 1998; 54: 259-267.
- Ekmekcioglu, C., Strauss-Blasche, G., Holzer, F., Marktl, W. Effect of sulfur baths on antioxidative defense systems, peroxide concentrations and lipid levels in patients with degenerative osteoarthritis. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd.* 2002; 9(4): 216-220.
- Esbensen, A.J. Health conditions associated with aging and end of life of adults with Down syndrome. *Int Rev Res Ment Retard.* 2010; 39(C): 107-126.
- Etcheberrigaray, R., Ibarreta, D. Ionic channels and second messenger alterations in Alzheimer's disease. Relevance of studies in nonneuronal cells. *Rev Neurol.* 2001; 33(8): 740-749.
- Eto, K., Asada, T., Arima, K., Makifuchi, T., Kimura, H. Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 293(5): 1485-1488.
- Fenech, M.F., Dreosti, I.E., Rinaldi, J.R. Folate, vitamin B12, homocysteine status and chromosome damage rate in lymphocytes of older men. *Carcinogenesis.* 1997; 18(7): 1329-1336.
- Fenech, M. Micronucleus frequency in human lymphocytes is related to plasma vitamin B12 and homocysteine. *Mutat Res.* 1999; 428(1-2): 299-304.
- Feng, Y., Wang, X. Antioxidant therapies for Alzheimer's disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2012; 2012: 472932.
- Fernhall, B., Figueroa, A., Collier, S., Gouloupoulou, S., Giannopoulou, I., Baynard, T. Resting metabolic rate is not reduced in obese adults with Down syndrome. *Ment Retard.* 2005; 43(6): 391-400.
- Fillenbaum, G.G., Kuchibhatla, M.N., Hanlon, J.T., Artz, M.B., Pieper, C.F., Schmader, K.E., Dysken, M.W., Gray, S.L. Dementia and Alzheimer's disease in community-dwelling elders taking vitamin C and/or vitamin E. *Ann Pharmacother.* 2005; 39(12): 2009-2014.

- Forbes, G.B., Bruining, G.J. Urinary creatinine excretion and lean body mass. *Am J Clin Nutr.* 1976; 29: 1359-1366.
- Fort, P., Lifshitz, F., Bellisario, R., Davis, J., Lanes, R., Pugliese, M., Richman, R., Post, E.M., *et al.* Abnormalities of thyroid function in infants with Down syndrome. *J Pediatr.* 1984; 104(4): 545-549.
- Frei, B., Stocker, R., England, L., Ames, B.N. Ascorbate: The most effective antioxidant in human blood plasma. *Adv Exp Med Biol.* 1990; 264: 155-163.
- de la Fuente, M., Victor, V.M. Ascorbic acid and N-acetylcysteine improve in vitro the function of lymphocytes from mice with endotoxin-induced oxidative stress. *Free Radic Res.* 2001; 35(1): 73-84.
- Gabbita, S.P., Lovell, M.A., Markesbery, W.R. Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 1998; 71(5): 2034-2040.
- Galasko, D.R., Peskind, E., Clark, C.M., Quinn, J.F., Ringman, J.M., Jicha, G.A., Cotman, C., Cottrell, B., *et al.* Antioxidants for Alzheimer Disease: A Randomized Clinical Trial With Cerebrospinal Fluid Biomarker Measures. *Arch Neurol.* 2012; 69(7): 836-841.
- Gao, S., Qin, T., Liu, Z., Caceres, M.A., Ronchi, C.F., Chen, C.Y., Yeum, K.J., Taylor, A., *et al.* Lutein and zeaxanthin supplementation reduces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage in human lens epithelial cells. *Mol Vis.* 2011; 17: 3180-3190.
- Garcia, A., Zanibbi, K. Homocysteine and cognitive function in elderly people. *CMAJ.* 2004; 171(8): 897-904.
- Garcia, C.L., Filippi, S., Mosesso, P., Calvani, M., Nicolai, R., Mosconi, L., Palitti, F. The protective effect of L-carnitine in peripheral blood human lymphocytes exposed to oxidative agents. *Mutagenesis.* 2006; 21(1): 21-27.
- Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F., Scaccini, C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med.* 2000; 29(11): 1106-1114.
- Ghosh, S., Hong, C.S., Feingold, E., Ghosh, P., Ghosh, P., Bhaumik, P., Dey, S.K. Epidemiology of Down syndrome: new insight into the multidimensional interactions among genetic and environmental risk factors in the oocyte. *Am J Epidemiol.* 2011; 174(9): 1009-1016.



- Gibson, G.E., Huang, H.M. Oxidative processes in the brain and non-neuronal tissues as biomarkers of Alzheimer's disease. *Front Biosci.* 2002; 7: d1007-d1015.
- Giulivi, C., Traaseth, N.J., Davies, K.J. Tyrosine oxidation products: analysis and biological relevance. *Amino Acids.* 2003; 25(3-4): 227-232.
- Glabe, C.C. Amyloid accumulation and pathogenesis of Alzheimer's disease: significance of monomeric, oligomeric and fibrillar A $\beta$ . *Subcell Biochem.* 2005; 38: 167-177.
- Glasson, E.J., Sullivan, S.G., Hussain, R., Petterson, B.A., Montgomery, P.D., Bittles, A.H. The changing survival profile of people with Down's syndrome: implications for genetic counselling. *Clin Genet.* 2002; 62(5): 390-393.
- Gong, Q.H., Wang, Q., Pan, L.L., Liu, X.H., Huang, H., Zhu, Y.Z. Hydrogen sulfide attenuates lipopolysaccharide-induced cognitive impairment: a pro-inflammatory pathway in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2010; 96(1): 52-58.
- González-Martínez, Á., Rosado, B., Pesini, P., Suárez, M.L., Santamarina, G., García-Belenguer, S., Villegas, A., Monleón, I., *et al.* Plasma  $\beta$ -amyloid peptides in canine aging and cognitive dysfunction as a model of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol.* 2011; 46(7): 590-596.
- Green, A.L., Hultman, E., Macdonald, I.A., Sewell, D.A., Greenhaff, P.L. Carbohydrate ingestion augments skeletal muscle creatine accumulation during creatine supplementation in humans. *Am J Physiol.* 1996; 271(5 Pt 1): E821-826.
- Greilberger, J., Koidl, C., Greilberger, M., Lamprecht, M., Schroecksnadel, K., Leblhuber, F., Fuchs, D., Oettl, K. Malondialdehyde, carbonyl proteins and albumin-disulphide as useful oxidative markers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Free Radic Res.* 2008; 42(7): 633-638.
- Greilberger, J., Fuchs, D., Leblhuber, F., Greilberger, M., Wintersteiger, R., Tafeit, E. Carbonyl proteins as a clinical marker in Alzheimer's disease and its relation to tryptophan degradation and immune activation. *Clin Lab.* 2010; 56(9-10): 441-448.
- Groeger, G., Quiney, C., Cotter, T.G. Hydrogen peroxide as a cell-survival signaling molecule. *Antioxid Redox Signal.* 2009; 11(11): 2655-2671.
- Gupta, S.K., Venkateshan, V.S., Churg, J. Mesangiocapillary glomerulonephritis in Down's syndrome. *Am J Nephrol.* 1991; 11(2): 112-117.

- Gutiérrez, A., Alvestrand, A., Qureshi, G.A., Bergström, J. Influence of a meat-free diet on the urinary excretion of 3-methylhistidine and creatinine in chronic renal failure. *J Intern Med.* 1992; 232(2): 129-132.
- Haddow, J.E., Palomaki, G.E., Knight, G.J., Williams, J., Miller, W.A., Johnson, A. Screening of maternal serum for fetal Down's syndrome in the first trimester. *N Engl J Med.* 1998; 338(14): 955-961.
- Halliwel, B. Oxidants and the central nervous system: Some fundamental questions. *Acta Neurol Scand.* 1989; 126: 23-33.
- Halliwel, B., Gutteridge, J.M. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic Biol Med.* 1995; 18(1): 125-126.
- Halliwel, B., Gutteridge, J.M. Free radicals in biology and medicine. 4<sup>a</sup> Ed. New York. Oxford University Press Inc. 2007.
- Handel, L.N., Barqawi, A., Checa, G., Furness, P.D. 3rd, Koyle, M.A. Males with Down's syndrome and nonneurogenic neurogenic bladder. *J Urol.* 2003; 169(2): 646-964.
- Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci.* 1991; 12(10): 383-388.
- Hardy, J.A., Higgins, G.A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 1992; 256(5054): 184-185.
- Harkany, T., Mulder, J., Sasvári, M., Abrahám, I., Kónya, C., Zarándi, M., Penke, B., Luiten, P.G., *et al.* N-Methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 and radical scavengers protect cholinergic nucleus basalis neurons against beta-amyloid neurotoxicity. *Neurobiol Dis.* 1999; 6(2): 109-121.
- Harlow, S.D., Ephross, S.A. Epidemiology of menstruation and its relevance to women's health. *Epidemiol Rev.* 1995; 17(2): 265-286.
- Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956; 11(3): 298-300.
- Harrison, F.E., May, J.M. Vitamin C function in the brain: Vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free Radic Biol Med.* 2002; 46: 719-730.

- Harrison, F.E., Allard, J., Bixler, R., Usuh, C., Li, L., May, J.M., McDonald, M.P. Antioxidants and cognitive training interact to affect oxidative stress and memory in APP/PSEN1 mice. *Nutr Neurosci.* 2009; 12(5): 203-218.
- Harrison, F.E. A critical review of vitamin C for the prevention of age-related cognitive decline and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2012; 29(4): 711-26.
- Hasle, H., Clemmensen, I.H., Mikkelsen, M. Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *Lancet.* 2000; 355(9199): 165-169.
- Hazell, A.S., Normandin, L., Norenberg, M.D., Kennedy, G., Yi, J.H. Alzheimer type II astrocytic changes following sub-acute exposure to manganese and its prevention by antioxidant treatment. *Neurosci Lett.* 2006; 396(3): 167-171.
- Henchcliffe, C., Beal, M.F. Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. *Nat Clin Pract Neurol.* 2008; 4(11): 600-609.
- Hensley, K., Hall, N., Subramaniam, R., Cole, P., Harris, M., Aksenov, M., Aksenova, M., Gabbita, S.P., *et al.* Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *J Neurochem.* 1995; 65(5): 2146-2156.
- Hensley, K., Maidt, M.L., Yu, Z., Sang, H., Markesbery, W.R., Floyd, R.A. Electrochemical analysis of protein nitrotyrosine and dityrosine in the Alzheimer brain indicates region-specific accumulation. *J Neurosci.* 1998; 18(20): 8126-8132.
- Heo, H.J., Kim, D.O., Shin, S.C., Kim, M.J., Kim, B.G., Shin, D.H. Effect of antioxidant flavanone, naringenin, from Citrus junoson neuroprotection. *J Agric Food Chem.* 2004; 52(6): 1520-1525.
- Herholz, K., Ebmeier, K. Clinical amyloid imaging in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2011; 10(7): 667-670.
- Hernández, A. Niveles urinarios de los productos de peroxidación lipídica: Acción antioxidante en el organismo humano del tratamiento crenoterápico con aguas sulfuradas y peloides. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Madrid: UCM; 1997.
- Hernández, A., Ramón, J.R., Cuenca, E., Márquez, J. Acción antioxidante en el organismo humano del tratamiento crenoterápico con aguas sulfuradas y

- peloides, en relación con las vías de administración utilizadas. Boletín de la Sociedad Española de Hidrología Médica, 1998; XIII (1): 27-40.
- Hernández, A., Ramón, J.R., Casado, A., Cuenca-Giralde, A., Polo de Santos, M.M., García-Matas, A. Aguas minero-medicinales y efectos antioxidantes en el envejecimiento. En: Biogerontología Médica. Edit Ergon. Madrid 2009; 23: 325-342.
- Hernández-Torres, A., Ramón, J.R., Cuenca, E., Márquez, J. Acción antioxidante de la crenoterapia con aguas sulfuradas y peloides sobre el organismo humano en relación con la edad. Rev. Esp. Geriatr. Gerontol. 1999; 34: 215-225.
- Hernández-Torres, A., García-Matas, A., Casado-Moragón, A., Polo de Santos, M.M. Addendum a la Memoria médico-hidrológica y estudio de viabilidad hidroterápica de sus aguas minero-medicinales. 2007. pp:2-4.
- Hersey, D.W., Crandall, B.F., Perdue, S. Combining maternal age and serum  $\alpha$ -fetoprotein to predict the risk of Down síndrome. Obstet & Gynecol. 1986; 68(2): 177-180.
- Himmelfarb, J., McMonagle, E., McMenamin, E. Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. Kidney Int. 2000; 58(6): 2571-2578.
- Holding, S. Current state of screening for Down's syndrome. Ann Clin Biochem. 2002; 39(Pt 1): 1-11.
- den Hollander, J.G., Wulkan, R.W., Mantel, M.J., Berghout, A. Correlation between severity of thyroid dysfunction and renal function. Clin Endocrinol (Oxf). 2005; 62(4): 423-427.
- Hoogwerf, B.J., Laine, D.C., Greene, E. Urine C-peptide and creatinine (Jaffe method) excretion in healthy young adults on varied diets: sustained effects of varied carbohydrate, protein, and meat content. Am J Clin Nutr. 1986; 43(3): 350-360.
- Hook, E.B. Down's syndrome-frequency in human populations and factors pertinent to variation in rates. En: de la Cruz, F.F., Gerald, P.S., editores. Trisomy 21 (Down syndrome): research perspectives. Baltimore: University Park Press. 1981; p. 3-68.
- Hsiao, Y.H., Chen, P.S., Yeh, S.H., Lin, C.H., Gean, P.W. N-acetylcysteine prevents beta-amyloid toxicity by a stimulatory effect on p35/cyclin-dependent kinase 5 activity in cultured cortical neurons. J Neurosci Res. 2008; 86(12): 2685-2695.

- Hsiao, Y.H., Kuo, J.R., Chen, S.H., Gean, P.W. Amelioration of social isolation-triggered onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficit by N-acetylcysteine in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis.* 2012 Mar; 45(3): 1111-1120.
- Hu, M.L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol.* 1994; 233: 380-385.
- Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E., Chaudhuri, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987; 84(24): 9265-9269.
- Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I. Discoveries of tau, abnormally hyperphosphorylated tau and others of neurofibrillary degeneration: a personal historical perspective. *J Alzheimers Dis.* 2006; 9(3 Suppl): 219-242.
- Isobe, C., Abe, T., Terayama, Y. Levels of reduced and oxidized coenzyme Q-10 and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the CSF of patients with Alzheimer's disease demonstrate that mitochondrial oxidative damage and/or oxidative DNA damage contributes to the neurodegenerative process. *J Neurol.* 2010; 257(3): 399-404.
- Jacobsen, F.K., Christensen, C.K., Mogensen, C.E., Andreasen, F., Heilskov, N.S. Postprandial serum creatinine increase in normal subjects after eating cooked meat. *Proc Eur Dial Transplant Assoc.* 1979; 16: 506-512.
- Jaffé, M. (1986). Über den niederschlag, welchen pikrinsäure in normalen harn erzeugt und über eine neue reaktion des kreatinins. *Z Physiol Chem.* 1986; 10: 391-400.
- Jami, J. Transgenic mice: a tool for the study of tissue-specific gene expression. *Nouv Rev Fr Hematol.* 1988; 30(1-2): 7-11.
- Jovanovic, S.V., Clements, D., MacLeod, K. Biomarkers of oxidative stress are significantly elevated in Down syndrome. *Free Radic Biol Med.* 1998; 25(9): 1044-1048.
- Jüni, P., Nartey, L., Reichenbach, S., Sterchi, R., Dieppe, P.A., Egger, M. Risk of cardiovascular events and rofecoxib: cumulative meta-analysis. *Lancet.* 2004 Dec; 364(9450): 2021-2029.

- Kadioglu, E., Sardas, S., Aslan, S., Isik, E., Esat-Karakaya, A. Detection of oxidative DNA damage in lymphocytes of patients with Alzheimer's disease. *Biomarkers*. 2004; 9(2): 203-209.
- Källén, B., Mastroiacovo, P., Robert, E. Major congenital malformations in Down syndrome. *Am J Med Genet*. 1996; 65(2): 160-166.
- Kamoun, P. Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals. *Amino Acids*. 2004; 26(3): 243-254.
- Kavouras, S.A. Assessing hydration status. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2002; 5(5): 519-524.
- Keshaviah, P.R., Nolph, K.D., Moore, H.L., Prowant, B., Emerson, P.F., Meyer, M., Twardowski, Z.J., Khanna, R., *et al.* Lean Body Mass Estimation by Creatinine Kinetics. *J Am Soc Nephrol*. 1994; 4: 1475-1485.
- Kim, K.M., Jung, B.H., Paeng, K.J., Kim, I., Chung, B.C. Increased urinary F(2)-isoprostanes levels in the patients with Alzheimer's disease. *Brain Res Bull*. 2004; 64(1): 47-51.
- Kim, D., Nguyen, M.D., Dobbin, M.M., Fischer, A., Sananbenesi, F., Rodgers, J.T., Delalle, I., Baur, J.A., *et al.* SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J*. 2007; 26(13): 3169-3179.
- Kimura, Y., Kimura, H. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *FASEB J*. 2004; 18(10): 1165-1167.
- Kinsella, K., Phillips, D.R. Global Aging: The Challenge of Success. *Population Bulletin*. 2005; 60 (1): 5-42.
- Kölsch, H., Ludwig, M., Lütjohann, D., Rao, M.L. Neurotoxicity of 24-hydroxycholesterol, an important cholesterol elimination product of the brain, may be prevented by vitamin E and estradiol-17beta. *J Neural Transm*. 2001; 108(4): 475-488.
- Kontush, A., Mann, U., Arlt, S., Ujeyl, A., Lührs, C., Müller-Thomsen, T., Beisiegel, U. Influence of vitamin E and C supplementation on lipoprotein oxidation in patients with Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*. 2001; 31(3): 345-354.

- Kontush, K., Schekatolina, S. Vitamin E in neurodegenerative disorders: Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1031: 249-262.
- Kopple, J.D. Phenylalanine and tyrosine metabolism in chronic kidney failure. *J Nutr.* 2007; 137(6 Suppl 1): 1586S-1590S
- Korolainen, M.A., Pirttilä, T. Cerebrospinal fluid, serum and plasma protein oxidation in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand.* 2009; 119(1): 32-38.
- Korsager, S., Chatham, E.M., Ostergaard-Kristensen, H.P. Thyroid function tests in adults with Down's syndrome. *Acta Endocrinol.* 88: 1978; 48-54.
- Kreisman, S.H., Hennessey, J.V. Consistent reversible elevations of serum creatinine levels in severe hypothyroidism. *Arch Intern Med.* 1999; 159(1): 79-82.
- Krinsky, N.I. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1992; 200(2): 248-254.
- Kuboyama, T., Tohda, C., Komatsu, K. Neuritic regeneration and synaptic reconstruction induced by withanolide A. *Br J Pharmacol.* 2005; 144(7): 961-971.
- Lacor, P.N., Buniel, M.C., Furlow, P.W., Clemente, A.S., Velasco, P.T., Wood, M., Viola, K.L., Klein, W.L. Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2007; 27(4): 796-807.
- Lafayette, R.A., Costa, M.E., King, A.J. Increased serum creatinine in the absence of renal failure in profound hypothyroidism. *Am J Med.* 1994; 96(3): 298-299.
- Lander, H.M. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J.* 1997; 11(2): 118-124.
- Lee, S.H., Kim, I., Chung, B.C. Increased urinary level of oxidized nucleosides in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Clin Biochem.* 2007; 40(13-14): 936-938.
- Lee, M., Schwab, C., Yu, S., McGeer, E., McGeer, P.L. Astrocytes produce the antiinflammatory and neuroprotective agent hydrogen sulfide. *Neurobiol Aging.* 2009; 30(10): 1523-1534.

- Lee, M., Sparatore, A., Del Soldato, P., McGeer, E., McGeer, P.L. Hydrogen sulfide-releasing NSAIDs attenuate neuroinflammation induced by microglial and astrocytic activation. *Glia*. 2010; 58(1): 103-113.
- Lejeune, J., Gautier, M., Turpin, R. Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *CR Hebd Acad Sci* 1959; 248: 1721-1722.
- Lesko, L.J., Atkinson, A.J. Use of biomarkers and surrogate endpoints in drug development and regulatory decision making: criteria, validation, strategies. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001; 41: 347-366.
- Lesne, S., Kotilinek, L., Ashe, K.H. Plaque-bearing mice with reduced levels of oligomeric amyloid-beta assemblies have intact memory function. *Neuroscience*. 2008; 151: 745-749.
- Leutner, S., Schindowski, K., Frölich, L., Maurer, K., Kratzsch, T., Eckert, A., Müller, W.E. Enhanced ROS-generation in lymphocytes from Alzheimer's patients. *Pharmacopsychiatry*. 2005; 38(6): 312-315.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., *et al.* Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1990; 186: 464-478.
- Lew, S.W., Bosch, J.P. Effect of diet on creatinine clearance and excretion in young and elderly healthy subjects and in patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 1991; 2(4): 856-865.
- Li, Q.X., Fuller, S.J., Beyreuther, K., Masters, C.L. The amyloid precursor protein of Alzheimer disease in human brain and blood. *J Leukoc Biol*. 1999; 66(4): 567-574.
- Lindahl, T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*. 1993; 362(6422): 709-715.
- Liu, Q., Berchner-Pfannschmidt, U., Möller, U., Brecht, M., Wotzlaw, C., Acker, H., Jungermann, K., Kietzmann, T. A Fenton reaction at the endoplasmic reticulum is involved in the redox control of hypoxia-inducible gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(12): 4302-4307.
- Liu, J., Wang, L.N., Zhan, S.Y., Xia, Y. Coenzyme Q10 for Parkinson's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011; (12): CD008150.



- Lloret, A., Badía, M.C., Mora, N.J., Pallardó, F.V., Alonso, M.D., Viña, J. Vitamin E paradox in Alzheimer's disease: it does not prevent loss of cognition and may even be detrimental. *J Alzheimers Dis.* 2009; 17(1): 143-149.
- Loft, S., Vistisen, K., Ewertz, M., Tjønneland, A., Overvad, K., Poulsen, H.E. Oxidative DNA damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans: influence of smoking, gender and body mass index. *Carcinogenesis.* 1992; 13(12): 2241-2247.
- Loske, C., Gerdemann, A., Schepl, W., Wycislo, M., Schinzel, R., Palm, D., Riederer, P., Münch, G. Transition metal-mediated glycoxidation accelerates cross-linking of beta-amyloid peptide. *Eur J Biochem.* 2000; 267(13): 4171-4178.
- Lott, I.T., Lai, F. Dementia in Down's syndrome: observations from a neurology clinic. *Appl Res Ment Retard.* 1982; 3: 233-239.
- Lott, I.T., Doran, E., Nguyen, V.Q., Tournay, A., Head, E., Gillen, D.L. Down syndrome and dementia: a randomized, controlled trial of antioxidant supplementation. *Am J Med Genet A.* 2011; 155A(8): 1939-1948.
- Lott, I.T. Antioxidants in Down syndrome. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1822(5): 657-663.
- Luchsinger, J.A., Tang, M.X., Siddiqui, M., Shea, S., Mayeux, R. Alcohol intake and risk of dementia. *J Am Geriatr Soc.* 2004; 52(4): 540-546.
- Luke, A., Sutton, M., Schoeller, D.A., Roizen, N.J. Nutrient intake and obesity in prepubescent children with Down syndrome. *J Am Diet Assoc.* 1996; 96(12): 1262-1267.
- Lüth, H.J., Ogunlade, V., Kuhla, B., Kientsch-Engel, R., Stahl, P., Webster, J., Arendt, T., Münch, G. Age- and stage-dependent accumulation of advanced glycation end products in intracellular deposits in normal and Alzheimer's disease brains. *Cereb Cortex.* 2005; 15(2): 211-220.
- Lyras, L., Cairns, N.J., Jenner, A., Jenner, P., Halliwell, B. An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 1997; 68(5): 2061-2069.
- Maczurek, A., Hager, K., Kenklies, M., Sharman, M., Martins, R., Engel, J., Carlson, D.A., Münch, G. Lipoic acid as an anti-inflammatory and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008; 60(13-14): 1463-1470.

- Málaga, S., Pardo, R., Málaga, I., Orejas, G., Fernández-Toral, J. Renal involvement in Down syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2005; 20(5): 614-617.
- Mangiagalli, A., Samuele, A., Armentero, M.T., Bazzini, E., Nappi, G., Blandini, F. Effects of homocysteine on apoptosis-related proteins and anti-oxidant systems in isolated human lymphocytes. *Eur J Biochem.* 2004; 271(9): 1671-1676.
- Marcus, E.M., Jacobson, S. *Integrated Neuroscience: A Clinical Problem Solving Approach.* 1ª Ed. Springer Press. 2003. pp. 760.
- Markus, M.A., Morris, B.J. Resveratrol in prevention and treatment of common clinical conditions of aging. *Clin Interv Aging.* 2008; 3(2): 331-339.
- Martínez-García, A., Sastre, I., Recuero, M., Aldudo, J., Vilella, E., Mateo, I., Sánchez-Juan, P., Vargas, T., *et al.* PLA2G3, a gene involved in oxidative stress induced death, is associated with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2010; 22(4): 1181-1187.
- Matés, J.M., Pérez-Gómez, C., Núñez de Castro, I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 1999; 32(8): 595-603.
- Mattsson, N., Rosén, E., Hansson, O., Andreasen, N., Parnetti, L., Jonsson, M., Herukka, S.K., van der Flier, W.M., *et al.* Age and diagnostic performance of Alzheimer disease CSF biomarkers. *Neurology.* 2012; 78(7): 468-476.
- McIntosh, L.J., Trush, M.A., Troncoso, J.C. Increased susceptibility of Alzheimer's disease temporal cortex to oxygen free radical-mediated processes. *Free Radic Biol Med.* 1997; 23(2): 183-190.
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., Stadlan, E.M. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology.* 1984; 34: 939-944.
- Mecocci, P., Polidori, M.C., Cherubini, A., Ingegneri, T., Mattioli, P., Catani, M., Rinaldi, P., Cecchetti, R., *et al.* Lymphocyte oxidative DNA damage and plasma antioxidants in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2002; 59(5): 794-798.
- Mendoza-Núñez, V.M., Sánchez-Rodríguez, M.A., Retana-Ugalde, R., Vargas-Guadarrama, L.A., Altamirano-Lozano, M.A. Total antioxidant levels, gender,

- and age as risk factors for DNA damage in lymphocytes of the elderly. *Mech Ageing Dev.* 2001; 122(8): 835-847.
- Mercer, E.S., Broecker, B., Smith, E.A., Kirsch, A.J., Scherz, H.C., A Massad, C. Urological manifestations of Down síndrome. *J Urol.* 2004; 171(3): 1250-1253.
- Migliore, L., Fontana, I., Trippi, F., Colognato, R., Coppedè, F., Tognoni, G., Nucciarone, B., Siciliano, G. Oxidative DNA damage in peripheral leukocytes of mild cognitive impairment and AD patients. *Neurobiol Aging.* 2005; 26(5): 567-573.
- Mihçı, E., Akçurin, G., Eren, E., Kardelen, F., Akçurin, S., Keser, I., Ertuğ, H. Evaluation of congenital heart diseases and thyroid abnormalities in children with Down syndrome. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2010; 10(5): 440-445.
- Min, J.Z., Yamamoto, M., Yu, H.F., Higashi, T., Toyo'oka, T. Rapid and sensitive determination of the intermediates of advanced glycation end products in the human nail by ultra-performance liquid chromatography with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Biochem.* 2012; 424(2): 187-194.
- Miquel, J., Economos, A.C., Fleming, J., Johnson, J.E. Jr. Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol.* 1980; 15(6): 575-591.
- Miyamae, Y., Iwasaki, K., Kinae, N., Tsuda, S., Murakami, M., Tanaka, M., Sasaki, Y.F. Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens using the single-cell gel electrophoresis (comet) assay. 2. Relationship between DNA migration and alkaline condition. *Mutat Res.* 1997; 393(1-2): 107-113.
- Miyazawa, T., Fujimoto, K., Suzuki, T., Yasuda, K. Determination of phospholipid hydroperoxides using luminol chemiluminescence--high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol.* 1994; 233: 324-332.
- Moldéus, P., Cotgreave, I.A., Berggren, M. Lung protection by a thiol-containing antioxidant: N-acetylcysteine. *Respiration.* 1986; 50 Suppl 1: 31-42.
- Moltó, L. Tipos de aguas minero-medicinales en yacimientos arqueológicos de la Península Ibérica. *Espacio, Tiempo y Forma. Serie II, Historia Antigua.* 1992; 5: 211-228.
- Mondragón-Rodríguez, S., Basurto-Islas, G., Lee, H.G., Perry, G., Zhu, X., Castellani, R.J., Smith, M.A. Causes versus effects: the increasing complexities of Alzheimer's disease pathogenesis. *Expert Rev Neurother.* 2010; 10(5): 683-691.

- Montenegro, J., González, O., Saracho, R., Aguirre, R., González, O., Martínez, I. Changes in renal function in primary hypothyroidism. *Am J Kidney Dis.* 1996; 27(2): 195-198.
- Montgomery, S.A., Thal, L.J., Amrein, R. Meta-analysis of double blind randomized controlled clinical trials of acetyl-L-carnitine versus placebo in the treatment of mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease. *Int Clin Psychopharmacol.* 2003; 18(2): 61-71.
- Montilla-López, P., Muñoz-Agueda, M.C., Feijóo-López, M., Muñoz-Castañeda, J.R., Bujalance-Arenas, I., Túnez-Fiñana, I. Comparison of melatonin versus vitamin C on oxidative stress and antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease induced by okadaic acid in neuroblastoma cells. *Eur J Pharmacol.* 2002; 451(3): 237-243.
- Moreira, P.I., Harris, P.L., Zhu, X., Santos, M.S., Oliveira, C.R., Smith, M.A., Perry, G. Lipoic acid and N-acetyl cysteine decrease mitochondrial-related oxidative stress in Alzheimer disease patient fibroblasts. *J Alzheimers Dis.* 2007; 12(2): 195-206.
- Mórocz, M., Kálmán, J., Juhász, A., Sinkó, I., McGlynn, A.P., Downes, C.S., Janka, Z., Raskó, I. Elevated levels of oxidative DNA damage in lymphocytes from patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2002; 23(1): 47-53.
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65(1-2): 55-63.
- Mozota-Sagardia, J.R. Sulfurous crenotherapy in otorhinolaryngology. *Clin Lab (Zaragoza).* 1960; 70: 1-10.
- Münch, G., Cunningham, A.M., Riederer, P., Braak, E. Advanced glycation endproducts are associated with Hirano bodies in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1998; 796(1-2): 307-310.
- Musso, C.G., Macías-Núñez, J.F., Oreopoulos, D.G. Physiological similarities and differences between renal aging and chronic renal disease. *J Nephrol.* 2007; 20(5): 586-587.
- Musso, C.G., Michelangelo, H., Vilas, M., Reynaldi, J., Martinez, B., Algranati, L., Macías-Núñez, J.F. Creatinine reabsorption by the aged kidney. *Int Urol Nephrol.* 2009; 41(3): 727-731.

- Musso, C.G., Oreopoulos, D.G. Aging and physiological changes of the kidneys including changes in glomerular filtration rate. *Nephron Physiol.* 2011; 119 Suppl 1: p1-5.
- Mutter J, Curth A, Naumann J, Deth R, Walach H. Does inorganic mercury play a role in Alzheimer's disease? A systematic review and an integrated molecular mechanism. *J Alzheimers Dis.* 2010; 22(2): 357-374.
- Naderi, J., Lopez, C., Pandey, S. Chronically increased oxidative stress in fibroblasts from Alzheimer's disease patients causes early senescence and renders resistance to apoptosis by oxidative stress. *Mech Ageing Dev.* 2006; 127(1): 25-35.
- Nagahara, A.H., Merrill, D.A., Coppola, G., Tsukada, S., Schroeder, B.E., Shaked, G.M., Wang, L., Blesch, A., *et al.* Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nat Med.* 2009; 15(3): 331-337.
- Nagy, Z., Combrinck, M., Budge, M., McShane, R. Cell cycle kinesis in lymphocytes in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2002; 317(2): 81-84.
- Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992; 6(12): 3051-3064.
- Newberger, D.S. Down syndrome: prenatal risk assessment and diagnosis. *Am Fam Physician.* 2000; 62(4): 825-832
- Niki, E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med.* 2010; 49(4): 503-515.
- Nivsarkar, M., Banerjee, A., Padh, H. Cyclooxygenase inhibitors: a novel direction for Alzheimer's management. *Pharmacol Rep.* 2008; 60(5): 692-698.
- Noroozi, M., Angerson, W.J., Lean, M.E. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am J Clin Nutr.* 1998; 67(6): 1210-1218.
- Nyberg, D.A., Souter, V.L., El-Bastawissi, A., Young, S., Luthhardt, F., Luthy, D.A. Isolated sonographic markers for detection of fetal Down syndrome in the second trimester of pregnancy. *J Ultrasound Med.* 2001; 20(10): 1053-1063.

- Nyengaard, J.R., Bendtsen, T.F. Glomerular number and size in relation to age, kidney weight, and body surface in normal man. *Anat Rec.* 1992; 232(2): 194-201.
- Nyman, U., Björk, J., Sterner, G., Bäck, S.E., Carlson, J., Lindström, V., Bakoush, O., Grubb, A. Standardization of p-creatinine assays and use of lean body mass allow improved prediction of calculated glomerular filtration rate in adults: a new equation. *Scand J Clin Lab Invest.* 2006; 66(6): 451-468.
- Oberg, B.P., McMenamin, E., Lucas, F.L., McMonagle, E., Morrow, J., Ikizler, T.A., Himmelfarb, J. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2004; 65(3): 1009-1016.
- Odetti, P., Angelini, G., Dapino, D., Zaccheo, D., Garibaldi, S., Dagna-Bricarelli, F., Piombo, G., Perry, G., *et al.* Early glycoxidation damage in brains from Down's syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 243(3): 849-851.
- Okado-Matsumoto, A., Fridovich, I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem.* 2001; 276(42): 38388-38393.
- Olovnikov, A.M. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol.* 1973; 41(1): 181-190.
- Ono, K., Hasegawa, K., Naiki, H., Yamada, M. Preformed beta-amyloid fibrils are destabilized by coenzyme Q10 in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 330(1): 111-116.
- Ord, W.M. The Bradshaw Lecture on Myxoedema and Allied Disorders: Delivered before the Royal College of Physicians. *Br Med J.* 1898; 2(1976): 1473-1479.
- Otero, A., Zunzunegui, MV, Rodríguez-Laso, A., Aguilar, MD., Lázaro, P. Volumen y tendencias de la dependencia asociada al envejecimiento en la población española. *Rev Esp Salud Pública.* 2004; 78: 201-213.
- Ott, A., Stolk, R.P., van Harskamp, F., Pols, H.A., Hofman, A., Breteler, M.M. Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. *Neurology.* 1999; 53(9): 1937-1942.

- Ottaviano, G., Marioni, G., Giacomelli, L., La Torre, F.B., Staffieri, .C, Marchese-Ragona, R., Staffieri, A. Smoking and chronic rhinitis: effects of nasal irrigations with sulfurous-arsenical-ferruginous thermal water: A prospective, randomized, double-blind study. *Am J Otolaryngol.* 2012; 33(6): 657-662.
- Padurariu, M., Ciobica, A., Hritcu, L., Stoica, B., Bild, W., Stefanescu, C. Changes of some oxidative stress markers in the serum of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2010; 469(1): 6-10.
- Pallardó, F.V., Degan, P., d'Ischia, M., Kelly, F.J., Zatterale, A., Calzone, R., Castello, G., Fernandez-Delgado, R., *et al.* Multiple evidence for an early age pro-oxidant state in Down Syndrome patients. *Biogerontology.* 2006; 7(4): 211-220.
- Pallardó, F.V., Lloret, A., Lebel, M., d'Ischia, M., Cogger, V.C., Le Couteur, D.G., Gadaleta, M.N., Castello, G., *et al.* Mitochondrial dysfunction in some oxidative stress-related genetic diseases: Ataxia-Telangiectasia, Down Syndrome, Fanconi Anaemia and Werner Syndrome. *Biogerontology.* 2010; 11(4): 401-419.
- Pallotti, S., Giuliano, S., Giambi, C. Growth disorders in Down's syndrome: growth hormone treatment. *Minerva Endocrinol.* 2002; 27(2): 59-64.
- Passa, J. Senescence and possibilities of sulfurous crenotherapy in respiratory pathology. *Gaz Med Fr.* 1964; 71: 1741-1742.
- Pastor, X., Quintó, L., Corretger, M., Gassió, R., Hernández, M., Serés, A. Tablas de crecimiento actualizadas de los niños españoles con síndrome de Down. *Revista Médica Internacional sobre el Síndrome de Down.* 2004; 8: 34-46.
- Patel, B.N., Seltzer, G.B., Wu, H.S., Schupf, N. Effect of menopause on cognitive performance in women with Down syndrome. *Neuroreport.* 2001; 12(12): 2659-2662.
- Pavlik, V.N., Doody, R.S., Rountree, S.D., Darby, E.J. Vitamin E use is associated with improved survival in an Alzheimer's disease cohort. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2009; 28(6): 536-540.
- Pereira, C., Santos, M.S., Oliveira, C. Involvement of oxidative stress on the impairment of energy metabolism induced by A betapeptides on PC12 cells: protection by antioxidants. *Neurobiol Dis.* 1999; 6(3): 209-219.
- Pérez-Rivero, G., Ruiz-Torres, M.P., Díez-Marqués, M.L., Canela, A., López-Novoa, J.M., Rodríguez-Puyol, M., Blasco, M.A., Rodríguez-Puyol, D. Telomerase

- deficiency promotes oxidative stress by reducing catalase activity. *Free Radic Biol Med.* 2008; 45(9): 1243-1251.
- Perna, A.F., Ingrosso, D., De Santo, N.G. Homocysteine and oxidative stress. *Amino Acids.* 2003; 25(3-4): 409-417.
- Petersen, R.C., Thomas, R.G., Grundman, M., Bennett, D., Doody, R., Ferris, S., Galasko, D., Jin, S., *et al.* Vitamin E and donepezil for the treatment of mild cognitive impairment. *N Engl J Med.* 2005; 352(23): 2379-2388.
- Petkov, V., Martin, J.A., Merida, E., Gutierrez, M.J. Deterioro de función renal asociado a hipotiroidismo. *Nefrología.* 2010; 30(3): 378-380.
- Pettegrew, J.W., Klunk, W.E., Panchalingam, K., Kanfer, J.N., McClure, R.J. Clinical and neurochemical effects of acetyl-L-carnitine in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 1995; 16(1): 1-4.
- Picerno, I., Chirico, C., Condello, S., Visalli, G., Ferlazzo, N., Gorgone, G., Caccamo, D., Ientile, R. Homocysteine induces DNA damage and alterations in proliferative capacity of T-lymphocytes: a model for immunosenescence? *Biogerontology.* 2007; 8(2): 111-119.
- Pimplikar, S.W. Reassessing the Amyloid Cascade Hypothesis of Alzheimer's Disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009; 41(6): 1261-1268.
- Pisaneschi, M. Inhalation therapy with sulfurous water in aged patients. *Poumon Coeur.* 1979; 35(6): 401-402.
- Pithadia, A.S., Lim, M.H. Metal-associated amyloid- $\beta$  species in Alzheimer's disease. *Curr Opin Chem Biol.* 2012; 16(1-2): 67-73.
- Pocernich, C.B., Butterfield, D.A. Elevation of glutathione as a therapeutic strategy in Alzheimer disease. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1822(5): 625-630.
- Polidori, M.C., Cherubini, A., Senin, U., Mecocci, P. Peripheral non-enzymatic antioxidant changes with human aging: a selective status report. *Biogerontology.* 2001; 2(2): 99-104.
- Polidori, M.C., Mattioli, P., Aldred, S., Cecchetti, R., Stahl, W., Griffiths, H., Senin, U., Sies, H., *et al.* Plasma antioxidant status, immunoglobulin g oxidation and lipid peroxidation in demented patients: relevance to Alzheimer disease and vascular dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2004; 18(3-4): 265-270.



- Prasher, V.P. Down syndrome and thyroid disorders: a review. *Downs Syndr Res Pract.* 1999; 6(1): 25-42.
- Predmore, B.L., Lefer, D.J., Gojon, G. Hydrogen sulfide in biochemistry and medicine. *Antioxid Redox Signal.* 2012; 17(1): 119-140.
- Prévost, M.C., Montastruc, P., Douste-Blazy, L. The effect of vaporization with thermal sulfurous water on phospholipids in the broncho-alveolar lavage solution following hypobaric hypoxia in the rat. *Arch Int Physiol Biochim.* 1983; 91(3): 197-203.
- Proctor, D.N., Balagopal, P., Nair, K.S. Age-related sarcopenia in humans is associated with reduced synthetic rates of specific muscle proteins. *J Nutr.* 1998; 128(2 Suppl): 351S-355S.
- Proesmans, W., De Cock, P., Eyskens, B. A toddler with Down syndrome, hypercalcaemia, hypercalciuria, medullary nephrocalcinosis and renal failure. *Pediatr Nephrol.* 1995; 9(1): 112-114
- Pryor, W.A., Godber, S.S. Noninvasive measures of oxidative stress status in humans. *Free Radic Biol Med.* 1991; 10(3-4): 177-184.
- Puertas, M.C., Martínez-Martos, J.M., Cobo, M.P., Carrera, M.P., Mayas, M.D., Ramírez-Expósito, M.J. Plasma oxidative stress parameters in men and women with early stage Alzheimer type dementia. *Exp Gerontol.* 2012; 47(8): 625-630.
- Pueschel, S.M. Clinical aspects of Down syndrome from infancy to adulthood. *Am J Med Genet Suppl.* 1990; 7: 52-56.
- Pulido, R., Jiménez-Escrig, A., Orensanz, L., Saura-Calixto, F., Jiménez-Escrig, A. Study of plasma antioxidant status in Alzheimer's disease. *Eur J Neurol.* 2005; 12(7): 531-535.
- Qu, K., Lee, S.W., Bian, J.S., Low, C.M., Wong, P.T. Hydrogen sulfide: neurochemistry and neurobiology. *Neurochem Int.* 2008; 52(1-2): 155-165.
- Ramage, I.J., Durkan, A., Walker, K., Beattie, T.J. Hypercalcaemia in association with trisomy 21 (Down's syndrome). *J Clin Pathol.* 2002; 55(7): 543-534.
- Ramamoorthy, M., Sykora, P., Scheibye-Knudsen, M., Dunn, C., Kasmer, C., Zhang, Y., Becker, K.G., Croteau, D.L., *et al.* Sporadic Alzheimer disease fibroblasts display an oxidative stress phenotype. *Free Radic Biol Med.* 2012; 53(6): 1371-1380.

- Reiter, R.J. Oxidative processes and oxidative defense mechanism in the aging brain. *FASEB J* 1995; 9: 526-533.
- Reitz, C. Alzheimer's disease and the amyloid cascade hypothesis: a critical review. *Int J Alzheimers Dis.* 2012; 2012: 369808.
- Remer, T., Neubert, A., Maser-Gluth, C. Anthropometry-based reference values for 24-h urinary creatinine excretion during growth and their use in endocrine and nutritional research. *Am J Clin Nutr.* 2002; 75(3): 561-569.
- Remington, R., Chan, A., Paskavitz, J., Shea, T.B. Efficacy of a vitamin/nutriceutical formulation for moderate-stage to later-stage Alzheimer's disease: a placebo-controlled pilot study. *Am J Alzheimers Dis Other Dement.* 2009; 24(1): 27-33.
- Reynolds, M.R., Berry, R.W., Binder, L.I. Site-specific nitration and oxidative dityrosine bridging of the tau protein by peroxynitrite: implications for Alzheimer's disease. *Biochemistry.* 2005; 44(5): 1690-1700.
- Ribeiro, M.L., Arçari, D.P., Squassoni, A.C., Pedrazzoli, J. Jr. Effects of multivitamin supplementation on DNA damage in lymphocytes from elderly volunteers. *Mech Ageing Dev.* 2007; 128(10): 577-580.
- Ricci, G., Zacccone, G. Sulfurous-salt hydropinotherapy in minor hepato-digestive pathology. Preliminary results with Acqua Marcia di Acqui. *Minerva Ecol Idroclimatol Fis Sanit.* 1975; 15(2): 48-58.
- Ricci, J.E., Waterhouse, N., Green, D.R. Mitochondrial functions during cell death, a complex (I-V) dilemma. *Cell Death Differ.* 2003 May; 10(5): 488-492.
- Ringman, J., Cole, G., Teng, E., Badmaev, V, Bardens, J., Frautschy, S., Rosario, E., Fein, J., *et al.* Oral curcumin for the treatment of mild-to-moderate Alzheimer's disease: Tolerability and clinical and biomarker efficacy results of a placebo-controlled 24-week study. *Alzheimers Dement.* 2008; 4: T774.
- Riviere, S., Birlouez-Aragon, I., Vellas, B. Plasma protein glycation in Alzheimer's disease. *Glycoconj J.* 1998; 15(10): 1039-1042.
- Robson, W.L., Leung, A.K., Woodman, R.C., Trevenen, C.L. Anti-neutrophil cytoplasmic antibody associated glomerulonephritis in a patient with Down's syndrome. *Pediatr Nephrol.* 1995; 9(2): 204-205.
- Rocchi, A., Pellegrini, S., Siciliano, G., Murri, L. Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review. *Brain Res Bull.* 2003; 61(1): 1-24.

- Roizen, N.J., Patterson, D. Down's syndrome. *Lancet*. 2003; 361(9365): 1281-1289.
- Ronen, A., Glickman, B.W. Human DNA repair genes. *Environ Mol Mutagen*. 2001; 37(3): 241-283.
- Roth, M., Tym, E., Mountjoy, C.Q., Huppert, F.A., Hendrie, H., Verma, S., Goddard, R. CAMDEX: a standardized instrument for the diagnosis of mental disorders in the elderly with special reference to the early detection of dementia. *Br J Psychiatry* 1986; 149: 698-709.
- Rusina, R., Matěj, R., Kašparová, L., Kukal, J., Urban, P. Higher aluminum concentration in Alzheimer's disease after Box-Cox data transformation. *Neurotox Res*. 2011; 20(4): 329-333.
- Said, S.M., Cornell, L.D., Sethi, S., Fidler, M.E., Al Masri, O., Marple, J., Nasr, S.H. Acquired glomerular lesions in patients with Down syndrome. *Hum Pathol*. 2012; 43(1): 81-88.
- Samiec, P.S., Drews-Botsch, C., Flagg, E.W., Kurtz, J.C., Sternberg, P. Jr., Reed, R.L., Jones, D.P. Glutathione in human plasma: decline in association with aging, age-related macular degeneration, and diabetes. *Free Radic Biol Med*. 1998; 24(5): 699-704.
- Sano, M., Ernesto, C., Thomas, R.G., Klauber, M.R., Schafer, K., Grundman, M., Woodbury, P., Growdon, J., *et al*. A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. *N Engl J Med*. 1997; 336(17): 1216-1222.
- Sarasa, M., Pesini, P. Natural non-transgenic animal models for research in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2009; 6(2): 171-178.
- Satgé, D., Sasco, A.J., Day, S., Culine, S. A lower risk of dying from urological cancer in Down syndrome: clue for cancer protecting genes on chromosome 21. *Urol Int*. 2009; 82(3): 296-300.
- Schaeffer, E.L., Figueiro, M., Gattaz, W.F. Insights into Alzheimer disease pathogenesis from studies in transgenic animal models. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011; 66 Suppl 1: 45-54.
- Schellenberg, G.D. Progress in Alzheimer's disease genetics. *Curr Opin Neurol*. 1995; 8(4): 262-267.

- Schupf, N., Zigman, W., Kapell, D., Lee, J.H., Kline, J., Levin, B. Early menopause in women with Down's syndrome. *J Intellect Disabil Res.* 1997; 41 (Pt 3): 264-267.
- Schupf, N., Pang, D., Patel, B.N., Silverman, W., Schubert, R., Lai, F., Kline, J.K., Stern, Y., *et al.* Onset of dementia is associated with age at menopause in women with Down's syndrome. *Ann Neurol.* 2003; 54(4): 433-438.
- Scott, J.W., Cort, W.M., Harley, H., Parrish, D.R., Saucy, G. 6-Hydroxychroman-2-carboxylic acids: Novel antioxidants. 1974; 51(5): 200-203.
- Selkoe, D.J. Aging, amyloid, and Alzheimer's disease: a perspective in honor of Carl Cotman. *Neurochem Res.* 2003; 28(11): 1705-1713.
- Shaposhnikov, A.M., Khal'chitskiĭ, S.E., Shvarts, E.I. Disorders of phenylalanine and tyrosine metabolism in Down's syndrome. *Vopr Med Khim.* 1979; 25(1): 15-19.
- Shastri, B.S., Giblin, F.J. Genes and susceptible loci of Alzheimer's disease. *Brain Res Bull.* 1999; 48: 121-127.
- Sherman, S.L., Allen, E.G., Bean, L.H., Freeman, S.B. Epidemiology of Down syndrome. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2007; 13(3): 221-227.
- Sies, H. (editor). *Oxidative stress: oxidants and antioxidants.* London. Academic Press. 1991. p. 1.
- Sies, H., Stahl, W., Sundquist, A.R. Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Ann N Y Acad Sci.* 1992; 669: 7-20.
- Sigaud, S., Evelson, P., González-Flecha, B. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced proliferation of primary alveolar epithelial cells is mediated by MAP kinases. *Antioxid Redox Signal.* 2005; 7(1-2): 6-13.
- Sinem, F., Dildar, K., Gökhan, E., Melda, B., Orhan, Y., Filiz, M. The serum protein and lipid oxidation marker levels in Alzheimer's disease and effects of cholinesterase inhibitors and antipsychotic drugs therapy. *Curr Alzheimer Res.* 2010; 7(5): 463-469.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988; 175(1): 184-191.
- Singh, M., Dang, T.N., Arseneault, M., Ramassamy, C. Role of by-products of lipid oxidation in Alzheimer's disease brain: a focus on acrolein. *J Alzheimers Dis.* 2010; 21(3): 741-756.

- Slater, T.F. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J.* 1984; 222(1): 1-15.
- Slevin, J.T., Gash, D.M., Smith, C.D., Gerhardt, G.A., Kryscio, R., Chebrolu, H., Walton, A., Wagner, R., *et al.* Unilateral intraputamin glial cell line-derived neurotrophic factor in patients with Parkinson disease: response to 1 year each of treatment and withdrawal. *Neurosurg Focus.* 2006; 20(5): E1.
- Small, G.W., Siddarth, P., Silverman, D.H., Ercoli, L.M., Miller, K.J., Lavretsky, H., Bookheimer, S.Y., Huang, S.C., *et al.* Cognitive and cerebral metabolic effects of celecoxib versus placebo in people with age-related memory loss: randomized controlled study. *Am J Geriatr Psychiatry.* 2008; 16(12): 999-1009.
- Smith, M.A., Sayre, L.M., Anderson, V.E., Harris, P.L., Beal, M.F., Kowall, N., Perry, G. Cytochemical demonstration of oxidative damage in Alzheimer disease by immunochemical enhancement of the carbonyl reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *J Histochem Cytochem.* 1998; 46(6): 731-735.
- Smith, D.S. Health care management of adults with Down syndrome. *Am Fam Physician.* 2001; 64(6): 1031-1038.
- Smith, C.C., O'Donovan, M.R., Martin, E.A. hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDOIII. *Mutagenesis.* 2006; 21(3): 185-190.
- Snijders, R.J., Sundberg, K., Holzgreve, W., Henry, G., Nicolaides, K.H. Maternal age- and gestation-specific risk for trisomy 21. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1999; 13(3): 167-170.
- Sobradillo, B., Aguirre, A., Aresti, U., Bilbao, C., Fernández-Ramos, C., Lizarraga, A., Lorenzo, H., Madariaga, L., *et al.* Curvas y tablas de crecimiento (estudio longitudinal y transversal). En: F. Orbegozo Fundación (ed), *Patrones de crecimiento y desarrollo en España. Atlas de gráficas y tablas*, Ergón, Madrid, 2004.
- Soltani, F., Mosaffa, F., Iranshahi, M., Karimi, G., Malekaneh, M., Haghighi, F., Behravan, J. Evaluation of antigenotoxicity effects of umbelliprenin on human peripheral lymphocytes exposed to oxidative stress. *Cell Biol Toxicol.* 2009; 25(3): 291-296.
- Spector, A. Oxidative stress-induced cataract: mechanism of action. *FASEB J.* 1995; 9(12): 1173-1182.

- Sreelatha, S., Padma, P.R. Modulatory effects of *Moringa oleifera* extracts against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and oxidative damage. *Hum Exp Toxicol.* 2011; 30(9): 1359-1368.
- Strauss, D., Zigman, W.B. Behavioral capabilities and mortality risk in adults with and without Down syndrome. *Am J Ment Retard.* 1996; 101: 269-281.
- Suchy, J., Chan, A., Shea, T.B. Dietary supplementation with a combination of alpha-lipoic acid, acetyl-L-carnitine, glycerophosphocoline, docosahexaenoic acid, and phosphatidylserine reduces oxidative damage to murine brain and improves cognitive performance. *Nutr Res.* 2009; 29(1): 70-4.
- Sudheer, A.R., Muthukumaran, S., Kalpana, C., Srinivasan, M., Menon, V.P. Protective effect of ferulic acid on nicotine-induced DNA damage and cellular changes in cultured rat peripheral blood lymphocytes: a comparison with N-acetylcysteine. *Toxicol In Vitro.* 2007; 21(4): 576-585.
- Sultana, R., Mecocci, P., Mangialasche, F., Cecchetti, R., Baglioni, M., Butterfield, D.A. Increased protein and lipid oxidative damage in mitochondria isolated from lymphocytes from patients with Alzheimer's disease: insights into the role of oxidative stress in Alzheimer's disease and initial investigations into a potential biomarker for this dementing disorder. *J Alzheimers Dis.* 2011; 24(1): 77-84.
- Sung, S., Yao, Y., Uryu, K., Yang, H., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Praticò, D. Early vitamin E supplementation in young but not aged mice reduces Abeta levels and amyloid deposition in a transgenic model of Alzheimer's disease. *FASEB J.* 2004; 18(2): 323-325.
- Suwazono, Y., Akesson, A., Alfvén, T., Järup, L., Vahter, M. Creatinine versus specific gravity-adjusted urinary cadmium concentrations. *Biomarkers.* 2005; 10(2-3): 117-126.
- Takahashi, N., Kariya, S., Hirano, M., Ueno, S. Two novel spliced presenilin 2 transcripts in human lymphocyte with oxidant stress and brain. *Mol Cell Biochem.* 2003; 252(1-2): 279-283.
- Takemura, T., Yoshioka, K., Akano, N., Michihata, I., Okada, M., Maki, S., Shigematsu, H. Immunotactoid glomerulopathy in a child with Down syndrome. *Pediatr Nephrol.* 1993; 7(1): 86-88.

- Tanner, J.M. Growth at adolescence. 2<sup>a</sup> Ed. Oxford: Blacwell Scientific Publications, 1962.
- Tanzi, R.E. A genetic dichotomy model for the inheritance of Alzheimer's disease and common age-related disorders. *J Clin Invest.* 1999; 104(9): 1175-1179.
- Tchantchou, F., Graves, M., Rogers, E., Ortiz, D., Shea, T.B. N-acetyl cysteine alleviates oxidative damage to central nervous system of ApoE-deficient mice following folate and vitamin E-deficiency. *J Alzheimers Dis.* 2005; 7(2): 135-138; 173-180.
- Terry, R.D., Masliah, E., Salmon, D.P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L.A., Katzman, R. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol.* 1991; 30: 572-580.
- Texel, S.J., Mattson, M.P. Impaired adaptative celular responses to oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Antioxid Redox Signal.* 2011; 14(8): 1519-1534.
- Thiel, R., Fowkes, S.W. Down syndrome and thyroid dysfunction: should nutritional support be the first-line treatment?. *Med Hypotheses.* 2007; 69(4): 809-815.
- Thome, J., Münch, G., Müller, R., Schinzel, R., Kornhuber, J., Blum-Degen, D., Sitzmann, L., Rösler, M., *et al.* Advanced glycation endproducts-associated parameters in the peripheral blood of patients with Alzheimer's disease. *Life Sci.* 1996; 59(8): 679-685.
- Tice, R.R. y Vasquez, M. Protocol for the application of the pH>13 alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in mammalian cells. En: *Integrated Laboratory Systems*, Research Triangle Park, NC. 1999. <http://cometassay.com/>
- Tohda, C. Overcoming several neurodegenerative diseases by traditional medicines: the development of therapeutic medicines and unraveling pathophysiological mechanisms. *Yakugaku Zasshi.* 2008; 128(8): 1159-1167.
- de La Torre, R., Casado, A., López-Fernández, E., Carrascosa, D., Ramírez, V., Sáez, J. Overexpression of copper-zinc superoxide dismutase in trisomy 21. *Experientia.* 1996; 52(9): 871-873.

- Tórsdóttir, G., Kristinsson, J., Hreidarsson, S., Snaedal, J., Jóhannesson, T. Copper, ceruloplasmin and superoxide dismutase (SOD1) in patients with Down's syndrome. *Pharmacol Toxicol.* 2001; 89(6): 320-325.
- Toscano, E., Pacileo, G., Limongelli, G., Verrengia, M., Di Mita, O., Di Maio, S., Salerno, M., Del Giudice, E., *et al.* Subclinical hypothyroidism and Down's syndrome; studies on myocardial structure and function. *Arch Dis Child.* 2003; 88(11): 1005-1008.
- Trippi, F., Botto, N., Scarpato, R., Petrozzi, L., Bonuccelli, U., Latorraca, S., Sorbi, S., Migliore, L. Spontaneous and induced chromosome damage in somatic cells of sporadic and familial Alzheimer's disease patients. *Mutagenesis.* 2001; 16(4): 323-327.
- van Trotsenburg, A.S., Vulsma, T., van Rozenburg-Marres, S.L., van Baar, A.L., Ridder, J.C., Heymans, H.S., Tijssen, J.G., de Vijlder, J.J. The effect of thyroxine treatment started in the neonatal period on development and growth of two-year-old Down syndrome children: a randomized clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(6): 3304-3311.
- Tüysüz, B., Beker, D.B. Thyroid dysfunction in children with Down's syndrome. *Acta Paediatr.* 2001; 90(12): 1389-1393.
- Tyagi, N., Sedoris, K.C., Steed, M., Ovechkin, A.V., Moshal, K.S., Tyagi, S.C. Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 289(6): H2649-2656.
- United Nations. Dept. of Economic and Social Affairs. Population Division. World population aging, 1950-2050. United Nations, editores. New York. 2002; 483pp.
- Urcelay, E., Ibarreta, D., Parrilla, R., Ayuso, M.S., Martín-Requero, A. Enhanced proliferation of lymphoblasts from patients with Alzheimer dementia associated with calmodulin-dependent activation of the  $Na^+/H^+$  exchanger. *Neurobiol Dis.* 2001; 8(2): 289-298.
- Varley, H., Gowenlock, A.H., Bell, M. 1980. Non-protein nitrogen, urea, urate, creatine and creatinine. *Practical Clinical Biochemistry.* London: William Heinemann Medical Books Ltd.; p. 484-485.
- Vasanthi, P., Nalini, G., Rajasekhar, G. Status of oxidative stress in rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis.* 2009; 12(1): 29-33.



- Vaziri, H., Schächter, F., Uchida, I., Wei, L., Zhu, X., Effros, R., Cohen, D., Harley, C.B. Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. *Am J Hum Genet.* 1993; 52(4): 661-667.
- Villemagne, V.L., Fodero-Tavoletti, M.T., Pike, K.E., Cappai, R., Masters, C.L., Rowe, C.C. The ART of loss: Abeta imaging in the evaluation of Alzheimer's disease and other dementias. *Mol Neurobiol.* 2008; 38: 1-15.
- Viña, J., Gomez-Cabrera, M.C., Borrás, C. Fostering antioxidant defences: up-regulation of antioxidant genes or antioxidant supplementation? *Br J Nutr.* 2007; 98 Suppl 1: S36-40.
- Viña, J., Lloret, A., Giraldo, E., Badia, M.C., Alonso, M.D. Antioxidant pathways in Alzheimer's disease: possibilities of intervention. *Curr Pharm Des.* 2011; 17(35): 3861-3864.
- Voinescu, G.C., Shoemaker, M., Moore, H., Khanna, R., Nolph, K.D. The relationship between urine osmolality and specific gravity. *Am J Med Sci.* 2002; 323(1): 39-42.
- Walsh, D.M., Selkoe, D.J. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron.* 2004; 44: 181-193.
- Walsh, D.M., Selkoe, D.J. A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem.* 2007; 101: 1172-1184.
- Wang, R., Tang, X.C. Neuroprotective effects of huperzine A. A natural cholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Neurosignals.* 2005; 14(1-2): 71-82.
- Wang, M.J., Cai, W.J., Zhu, Y.C. Mechanisms of angiogenesis: role of hydrogen sulphide. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2010; 37(7): 764-771.
- Wickstrom, E., Maizels, M., Sabbagha, R.E., Tamura, R.K., Cohen, L.C., Pergament, E. Isolated fetal pyelectasis: assessment of risk for postnatal uropathy and Down syndrome. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1996; 8(4): 236-240.
- Wiggins, J. Why do our kidneys get old? *Nephron Exp Nephrol.* 2011; 119 Suppl 1: e1–e5.
- Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillère-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A.T., Zingraff, J., Jungers, P., Descamps-Latscha, B. Advanced oxidation

- protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 1996; 49(5): 1304-1313.
- Wollen, K.A. Alzheimer's disease: the pros and cons of pharmaceutical, nutritional, botanical, and stimulatory therapies, with a discussion of treatment strategies from the perspective of patients and practitioners. *Altern Med Rev.* 2010; 15(3): 223-244.
- Wong, S.H., Knight, J.A., Hopfer, S.M., Zaharia, O., Leach, C.N., Sunderman, F.W. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin Chem.* 1987; 33(2 Pt 1): 214-220.
- Yallampalli, S., Micci, M.A., Taglialatela, G. Ascorbic acid prevents beta-amyloid-induced intracellular calcium increase and cell death in PC12 cells. *Neurosci Lett.* 1998; 251(2): 105-108.
- Yamada, K., Tanaka, T., Han, D., Senzaki, K., Kameyama, T., Nabeshima, T. Protective effects of idebenone and alpha-tocopherol on beta-amyloid-(1-42)-induced learning and memory deficits in rats: implication of oxidative stress in beta-amyloid-induced neurotoxicity in vivo. *Eur J Neurosci.* 1999; 11(1): 83-90.
- Yanagisawa, K., Makita, Z., Shiroshita, K., Ueda, T., Fusegawa, T., Kuwajima, S., Takeuchi, M., Koike, T. Specific fluorescence assay for advanced glycation end products in blood and urine of diabetic patients. *Metabolism.* 1998; 47: 1348-1353.
- Yang, X., Yang, Y., Li, G., Wang, J., Yang, E.S. Coenzyme Q10 attenuates beta-amyloid pathology in the aged transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutation. *J Mol Neurosci.* 2008; 34(2): 165-171.
- Zachara, B.A., Gromadzińska, J., Wasowicz, W., Zbróg, Z. Red blood cell and plasma glutathione peroxidase activities and selenium concentration in patients with chronic kidney disease: a review. *Acta Biochim Pol.* 2006; 53(4): 663-677.
- Zachwieja, J., Zaniew, M., Bobkowski, W., Stefaniak, E., Warzywoda, A., Ostalska-Nowicka, D., Dobrowolska-Zachwieja, A., Lewandowska-Stachowiak, M., Siwińska, A. Beneficial in vitro effect of N-acetyl-cysteine on oxidative stress and apoptosis. *Pediatr Nephrol.* 2005; 20(6): 725-731.

- Zafrilla, P., Mulero, J., Xandri, J.M., Santo, E., Caravaca, G., Morillas, J.M. Oxidative stress in Alzheimer patients in different stages of the disease. *Curr Med Chem*. 2006; 13(9): 1075-1083.
- Zengi, O., Karakas, A., Ergun, U., Senes, M., Inan, L., Yucel, D. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine level and plasma paraoxonase 1 activity with Alzheimer's disease. *Clin Chem Lab Med*. 2011; 50(3): 529-534.
- von Zglinicki, T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci*. 2002; 27(7): 339-344.
- Zhang, H., Gao, Y., Zhao, F., Dai, Z., Meng, T., Tu, S., Yan, Y. Hydrogen sulfide reduces mRNA and protein levels of  $\beta$ -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 in PC12 cells. *Neurochem Int*. 2011; 58(2): 169-175.
- Zhou, P., Chen, Z., Zhao, N., Liu, D., Guo, Z.Y., Tan, L., Hu, J., Wang, Q., *et al*. Acetyl-L-carnitine attenuates homocysteine-induced Alzheimer-like histopathological and behavioral abnormalities. *Rejuvenation Res*. 2011; 14(6): 669-679.
- Zigman, W.B., Lott, I.T. Alzheimer's disease in Down syndrome: neurobiology and risk. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2007; 13(3): 237-246.
- Zorrilla, A.E. El envejecimiento y el estrés oxidativo. *Rev Cubana Invest Bioméd*. 2002; 21(3): 178-185.

## **ANEXO I**



## ANEXO I. ANÁLISIS A *POSTERIORI* DE LAS EDADES DE LOS PARTICIPANTES EN POBLACIÓN EA Y POBLACIÓN CONTROL

En este anexo figuran los resultados del análisis *a posteriori* realizado en la población con EA y su respectiva población control para determinar si existían diferencias entre las edades de los participantes. Se realizaron comparaciones dos a dos entre personas de diferente sexo dentro de cada población y entre personas del mismo sexo de ambas poblaciones. Las diferencias se analizaron mediante un ANOVA de una vía, estimando las diferencias significativas cuando  $P < 0,05$  usando el software estadístico SPSS v.17.

### 1. Comparación hombres-mujeres en población control.

	Edad	F	P
<b>Hombres</b>	74,6 ± 1,9	3,18	0,09
<b>Mujeres</b>	79,9 ± 1,3		

### 2. Comparación hombres-mujeres en población con EA.

	Edad	F	P
<b>Hombres</b>	78,9 ± 1,6	0,01	0,95
<b>Mujeres</b>	79,1 ± 1,7		

### 3. Comparación Control-EA en hombres.

	Edad	F	P
<b>Control</b>	74,6 ± 1,9	2,01	0,17
<b>EA</b>	78,9 ± 1,6		

### 4. Comparación Control-EA en mujeres.

	Edad	F	P
<b>Control</b>	79,9 ± 1,3	0,1	0,76
<b>EA</b>	79,1 ± 1,7		



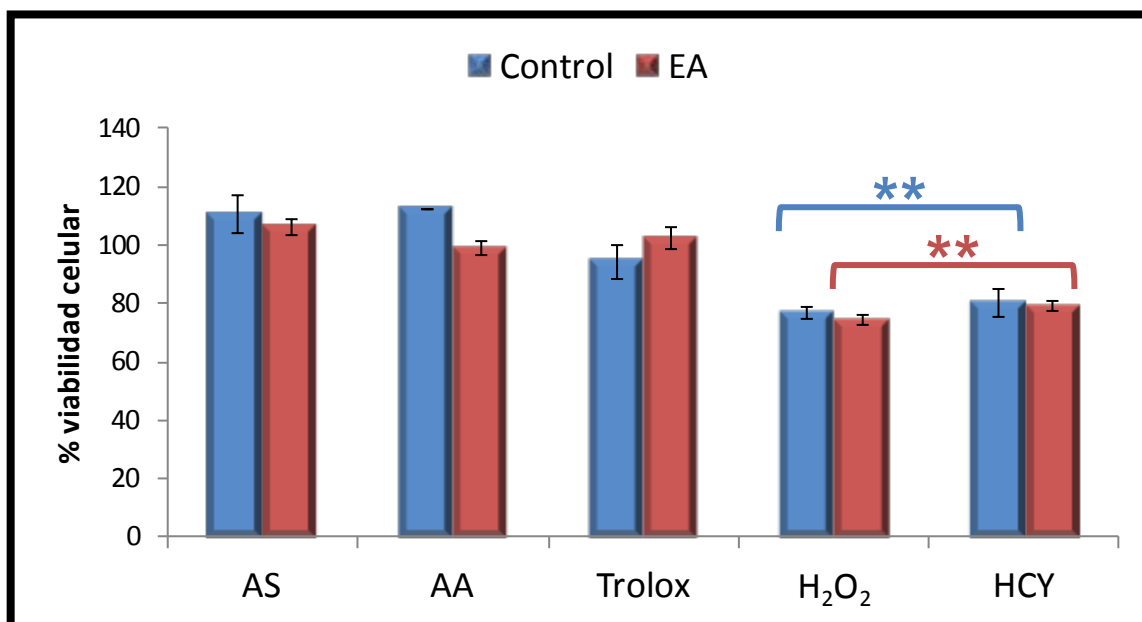
## **ANEXO II**





## ANEXO II. ANÁLISIS A *POSTERIORI* DE LOS TRATAMIENTOS CON ANTIOXIDANTES COMPARADOS CON LOS TRATAMIENTOS OXIDANTES EN POBLACIÓN CON EA Y POBLACIÓN CONTROL

En este anexo se muestran los resultados del análisis de los valores de viabilidad celular tras los tratamientos de inducción de daño oxidativo con  $H_2O_2$  y HCY comparados con los tratamientos de las células sólo con los antioxidantes seleccionados (Tratamientos A), ya que estos no mostraron diferencias significativas con la condición basal. El análisis se realizó mediante el test de Kruskal-Wallis usando el software SPSS v.17. De este modo, se demuestra que tanto la adición de  $H_2O_2$  como la de HCY a las CMSP disminuye significativamente su viabilidad respecto de su condición inicial (Figura 35).



**Figura 35. Comparación a posteriori de valores de viabilidad celular tras inducción de daño con  $H_2O_2$  y HCY.** Control- $H_2O_2$ :  $\chi^2= 67,52$ ; EA- $H_2O_2$ :  $\chi^2=41,14$ . Control-HCY:  $\chi^2= 41,85$ ; EA-HCY:  $\chi^2= 26,87$  \*\* $P<0,01$  respecto de los Tratamientos A. **AS:** Agua sulfurada; **AA:** Ácido ascórbico;  **$H_2O_2$ :** Peróxido de Hidrógeno; **HCY:** Homocisteína.



## **ANEXO III**



## RESEARCH ARTICLE

# Biomarkers of age effect on renal function in Down syndrome

Rodrigo Guzmán, Carlos Campos, Encarnación López-Fernández, and Ángela Casado

*Departamento de Medicina Celular y Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid, Spain*

### Abstract

**Objective:** To assess differences in kidney function between Down syndrome (DS) individuals and a control group related to aging.

**Methods:** Creatinine (Cr) and specific gravity (SG) were assessed by spectrophotometric and refractometric assays in urine samples of 103 individuals with DS and 82 age-matched controls.

**Results:** Significantly lower levels of Cr and SG were found in DS after puberty. Significant correlations were found between SG and age as well as between Cr and SG in DS and controls ( $p \leq 0.05$ ).

**Conclusions:** Premature aging in kidneys of DS patients could lead to an impaired renal function.

**Keywords:** Down syndrome, premature aging, creatinine, specific gravity, urine

## Introduction

Down syndrome (DS) or trisomy 21 is one of the most important human congenital diseases, occurring in 1 out of 700–1000 live births (Hook, 1981). Clinical symptoms were first described by John Langdon Down in 1866, but the association with one extra copy of chromosome 21 was first reported by Lejeune (1959). DS patients present different morphological characteristics such as short stature, obesity and bilateral epicanthic eyefolds. Furthermore, growth retardation has been noted during life. The syndrome is as well associated with mental retardation, elevated oxidative stress, congenital heart disease, immune system disorders, digestive problems, thyroid dysfunction, an increased risk of leukaemia, Alzheimer disease and premature aging.

Aging is a natural process that involves physical and physiological changes leading to a loss of different biological functions. These changes can affect, directly or indirectly, the kidney. It is well known that renal function declines with age (Wiggins, 2011). Two of the most useful indicators of renal function are urinary creatinine (Cr) and specific gravity (SG) (Vionescu et al., 2002; Nyman et al., 2006). Cr is a normal endogenous end-product of human metabolism. This non-proteic organic nitrogen compound is formed by spontaneous dehydration of

creatine and phospho-creatine from muscle metabolism. Cr is cleared from the body through the kidney mainly by glomerular filtration and to a lesser extent by active secretion from blood through the renal tubules (Boeninger et al., 1993). In addition to be a renal function indicator, Cr has been used as a muscle mass index (Keshaviah et al., 1994) or as an adjustment parameter for urine dilution. Urine SG is a unitless measure of the ratio between the density of urine and the density of water, and it is also used to assess the hydration status of an individual (Kavouras, 2002). Moreover, SG assessment is a fast, simple and inexpensive method to estimate the concentration or dilution ability of the kidneys (Vionescu et al., 2002).

An impaired renal function may lead to a reduced excretion of Cr (Wyss and Kaddurah, 2000). Several works reported significantly reduced Cr clearance and higher levels of Cr in plasma samples of DS patients (Coburn et al., 1967; Nishida et al., 1979). Coburn et al. (1967) suggested that a lower Cr clearance in DS may indicate that excretion by glomerular filtration is slightly impaired in these subjects. Moreover, different renal anomalies have been described in DS (Gupta et al., 1991; Mercer et al., 2004; Malaga et al., 2005) which could induce chronic renal disease in some cases leading to a diminished

*Address for Correspondence:* Ángela Casado, Departamento de Medicina Celular y Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), C/Ramiro de Maeztu, 9. E-28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 837 31 12, Fax: +34 91 536 04 32. E-mail: acasado@cib.csic.es

(Received 26 July 2011; accepted 20 September 2011)